

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392242** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.02.08

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.24

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **21164882.9**

(32) **2021.03.25**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/057752**

(87) **WO 2022/200493 2022.09.29**

(71) Заявитель:
ТЗ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ (CH)

(72) Изобретатель:

**Иттиг Симон, Каспер Кристоф,
Заупе Фальк, Амштуц Марлиз (CH),
Дюваль Мелоди (FR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации, содержащей рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и модулятор иммунной контрольной точки (ICM), и ее применению в способе профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта.

A1

202392242

202392242

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Область техники

Настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации, содержащей рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и модулятор иммунной контрольной точки (ICM), и ее применению в способе профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта.

Уровень техники

Несмотря на растущее количество средств для лечения рака в целом и комбинированных средств для лечения рака в частности, рак по-прежнему является третьей по распространенности причиной смерти во всем мире после сердечно-сосудистых заболеваний и инфекционных/паразитарных заболеваний; в абсолютных цифрах это соответствует 7,6 миллионам смертей (около 13% всех смертей) в любом году. По оценкам ВОЗ, к 2030 году смертность от рака возрастет до 13,1 миллиона человек. Эти статистические данные иллюстрируют тот факт, что рак остается важнейшим патологическим состоянием и что существует острая потребность в новых способах его лечения. В недавнем подходе для лечения рака использовали ингибиторы иммунных контрольных точек (CPI). За последние шесть лет на более чем 50 мировых рынках утверждены четыре рекомбинантных моноклональных антитела-ингибитора иммунных контрольных точек для лечения шести форм рака; ипилимумаб (антитело против CTLA-4), пембролизумаб и ниволумаб (антитела против PD-1) и атезолизумаб (антитело против PD-L1) с частотой реакции на лечение до 40–50% при использовании терапевтического средства на основе PD-1. Однако лечение существующими ингибиторами контрольных точек в качестве монотерапии не является эффективным при всех типах рака, поскольку опухоли с пониженной мутационной нагрузкой и/или пониженной иммуногенностью могут быть по своей природе устойчивыми к этой форме терапии. CPI, которые обычно считаются очень эффективными иммуномодулирующими агентами, дают относительно низкую частоту реакции на лечение при многих типах опухолей (в среднем < 20%; (Carretero-Gonzalez et al., 2018)), а некоторые виды рака, по-видимому, вообще не реагируют на них. Таким образом, в случае применения ингибиторов контрольных точек существует необходимость

перевода доли пациентов, для которых применение единственного агента, блокирующего контрольные точки, не должно быть полезным, в пациентов с длительным выживанием.

Обоснованием комбинированной терапии при раке обычно является применение 5 лекарственных средств с различными механизмами действия, что приводит к снижению вероятности развития устойчивых раковых клеток. С другой стороны, введение двух или более лекарственных средств для лечения конкретного состояния, например рака, обычно приводит к возникновению ряда потенциальных проблем из-за сложных взаимодействий между лекарственными средствами *in vivo*. Эффекты любого 10 отдельного препарата связаны с его всасыванием, распределением и выведением. При введении в организм двух лекарственных средств каждое лекарственное средство может влиять на всасывание, распределение и выведение другого и, следовательно, изменять эффекты этого другого средства. Например, одно лекарственное средство может ингибировать, активировать или индуцировать продукцию ферментов, 15 участвующих в метаболическом пути выведения другого лекарственного средства. Таким образом, при введении двух лекарственных средств для лечения одного и того же патологического состояния невозможно прогнозировать, будет ли каждое из них дополнять другое средство, не оказывать влияния на него или мешать его терапевтической активности у субъекта. Взаимодействие между двумя лекарственными 20 средствами может не только влиять на предполагаемую терапевтическую активность каждого лекарственного средства, но и повышать уровни токсичных метаболитов. Это взаимодействие может также усиливать или уменьшать побочные эффекты каждого лекарственного средства. Следовательно, при введении двух лекарственных средств для лечения заболевания невозможно прогнозировать, какое изменение - ухудшение 25 или улучшение - произойдет в профиле побочных эффектов каждого лекарственного средства. Кроме того, трудно точно прогнозировать, когда проявятся эффекты взаимодействия между двумя лекарственными средствами. Например, метаболические взаимодействия между лекарственными средствами могут стать очевидными при первоначальном введении второго лекарственного средства, после достижения ими 30 равновесной концентрации или после отмены одного из лекарственных средств. Следовательно, эффекты комбинированной терапии двумя или более лекарственными средствами сложно прогнозировать.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что комбинацию, содержащую рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, кодирующий гетерологичный белок, и модулятор иммунной контрольной точки (ICM), можно
5 применять для профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака. Неожиданно обнаружено, что лечение указанной комбинацией обеспечивает синергический противоопухолевый эффект.

Принимая во внимание эти неожиданные результаты, авторы настоящего изобретения
10 представляют настоящее изобретение в его следующих аспектах.

В первом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая:

- (a) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу
15 полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного
20 белка, функционально связана с промотором;
- (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей.

25 Во втором аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация,
30 описанная в настоящем документе, для применения в способе профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен набор компонентов, содержащий первый контейнер, второй контейнер и вкладыш в упаковку, причем указанный первый контейнер содержит по меньшей мере одну дозу лекарственного средства, содержащего рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, при этом указанный второй контейнер содержит по меньшей мере одну дозу лекарственного средства, содержащего ингибитор иммунной контрольной точки (ICM), а вкладыш в упаковку необязательно содержит инструкции по лечению субъекта от рака с применением указанных лекарственных средств.

15

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Плазмида вирулентности *Yersinia enterocolitica* pYV-MRS40, pYV. Плазмида вирулентности *Yersinia* (pYV) штамма MRS40 размером 75115 п.о. представлена в масштабе. Отмечены выбранный механизм T3SS, эффекторные белки T3SS, сайт начала репликации и факторы устойчивости к мышьяку (кодируемые генами *arsC*, *B*, *R* и *H*):

I - сайт начала репликации 53...203; II - *YopO* 7377...9566; III - *YopP* 10311...11177; IV - *YopQ* 12920...13468; V - *YopT* 13989...14957; VI - *sycT* 14957...15349; VII - *YopM* 18926...20029; VIII - *YopD* 21283...22203; IX - *YopB* 22222...23427; X - *sycD* 23405...23911; XI - *YopH* 47882...49288; XII - *sycH* 49516...49941; XIII - *sycE* 51552...51944; XIV - *YopE* 52137...52796; XV - *yadA* 62215...63678; XVI - *arsC* 67164...67589; XVII - *arsB* 67602...68891; XVIII - *arsR* 68937...69257; XIX - *arsH* 69343...70041

Фиг. 2: Модифицированная плазмида вирулентности *Yersinia enterocolitica* MRS40 pYV-Y004. pYV-Y004 размером 71408 п.о. представлена в масштабе. Отмечены выбранный механизм T3SS, нарушенные эффекторные белки T3SS, сайт начало репликации и гены устойчивости к мышьяку (кодируемые генами *arsC*, *B*, *R* и *H*)

30

I - сайт начала репликации 53...203; II - нарушенный YopO 7409...8116; III - нарушенный YopP 8597...8949; IV - YopQ 10692...11240; V - нарушенный YopT 11761...12301; VI - sycT 12301...12693; VII - нарушенный YopM 16270...17375; VIII - YopD 18629...19549; IX - YopB 19568...20773; X - sycD 20751...21257; XI - нарушенный YopH 45213...45563; XII - sycH 45791...46216; XIII - sycE 47827...48219; XIV - нарушенный YopE 48426...49089; XV - yadA 58508...59971; XVI - arsC 63457...63882; XVII - arsB 63895...65184; XVIII - arsR 65230...65550; XIX - arsH 65636...66334

Фиг. 3: Модифицированная плазмида вирулентности *Yersinia enterocolitica* MRS40 pYV-Y051, кодирующая YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека и-YopE₁₋₁₃₈-CARD2 RIG-I человека, кодируемые эндогенной плазмидой pYV в эндогенных сайтах yopH и yopE, соответственно. pYV-051 размером 73073 п.о. представлена в масштабе. Отмечены выбранный механизм T3SS, нарушенные эффекторные белки T3SS, белки-переносчики (YopE₁₋₁₃₈ в рамке считывания с доменами CARD2 hRigI и YopE₁₋₁₃₈ (с измененными кодонами) в рамке считывания с hcGAS₁₆₁₋₅₂₂), сайт начала репликации и гены устойчивости к мышьяку (кодируемых генами arsC, B, R и H):

I - сайт начала репликации 53...203; II - нарушенный YopO 7409...8116; III - нарушенный YopP 8597...8949; IV - YopQ 10692...11240; V - нарушенный YopT 11761...12301; VI - sycT 12301...12693; VII - нарушенный YopM 16270...17375; VIII - YopD 18629...19549; IX - YopB 19568...20773; X - sycD 20751...21257; XI - YopH::YopE₁₋₁₃₈ (после адаптации кодонов) hcGAS₁₆₁₋₅₂₂; 45228...46742; XII - sycH 46970...47395; XIII - sycE 49006...49398; XIV - YopE::YopE₁₋₁₃₈-hRigI (CARD2) 49591...50754; XV - yadA 60173...61636; XVI - arsC 65122...65547; XVII - arsB 65560...66849; XVIII - arsR 66895...67215; XIX - arsH 67301...67999;

Фиг. 4: Описание вектора pBad_Si_2. Карта вектора - плазмиды для клонирования pBad_Si_2 (5085 п.о.), которую применяли для получения гибридных конструкторов, содержащих YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и гибридный белок YopE₁₋₁₃₈-находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*.

I - область промотора araBAD 4...279; II - pBAD 250...277; III - MCS I 317...331; IV - sycE 339...731; V - YopE₁₋₁₃₈ 924...1337; VI - MCS II 1338...1361; VII - маркер Muc 1368...1397; VIII - маркер 6x his 1413...1430; IX - стоп-кодон 1431...1433; X - rrrB 1536...1693; XI - rrrB T2 1834...1861; XII - AmpR 1972...2832; XIII - сайт начала

репликации pBR322 2981...3609; XIV - araC 4181...5059;

Фиг. 5: Описание вектора pТЗР-454

Карта вектора - среднекопийной плазмиды для клонирования pТЗР-454 (5818 п.о.), кодирующей гибридный белок Rig1-CARD₂ (1-246 мыши) с кодон-оптимизированным YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и гибридный белок YopE₁₋₁₃₈ находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*.

5 YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и гибридный белок YopE₁₋₁₃₈ находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*.
I - область промотора araBAD 4...279; II - PBAD 250...277; III - MCS I 317...331; IV - SycE 339...731; V - YopE1-138 924...1337; VI - домены Rig1-CARD, заканчивающиеся стоп-кодоном 1349...2087; VII - маркер Mус 2101...2130; VIII - маркер 6x his 2146...2163; IX - второй стоп-кодон 2164...2166; X - rrrB 2269...2426; XI - rrrB T2 2567...2594; XII - ген устойчивости к ампициллину 2705...3565; XIII - сайт начала репликации pBR322 3714...4342; XIV - araC 4914...5792

Фиг. 6: Описание вектора pТЗР-453

Карта вектора - среднекопийной плазмиды для клонирования pТЗР-453 (5815 п.о.), кодирующей гибридный белок Rig1-CARD₂ (1-245 человека) с кодон-оптимизированным YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и гибридный белок YopE₁₋₁₃₈ находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*.

15 YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и гибридный белок YopE₁₋₁₃₈ находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*.
I - область промотора araBAD 4...279; II - PBAD 250...277; III - MCS I 317...331; IV - SycE 339...731; V - YopE1-138 924...1337; VI - домены Rig1-CARD человека, заканчивающиеся стоп-кодоном 1350...2087; VII - маркер Mус 2098...2127; VIII - маркер 6x his 2143...2160; IX - второй стоп-кодон 2161...2163; X - rrrB 2266...2423; XI - rrrB T2 2564...2591; XII - ген устойчивости к ампициллину 2702...3562; XIII - сайт начала репликации pBR322 3711...4339; XIV - araC 4911...5789

Фиг. 7: Описание вектора pТЗР-715. Карта вектора - среднекопийной плазмиды для

25 клонирования pТЗР-715 (4149 п.о.), которую применяли для получения гибридных конструкторов, содержащих YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и гибридный белок YopE₁₋₁₃₈ находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*. I - область промотора araBAD 4...279; II - PBAD 250...277; III - MCS I 317...331; IV - sycE 339...731; V - YopE1-138 924...1337; VI - MCS II 1338...1361; VII - маркер Mус 1368...1397; VIII - маркер 6x his 1413...1430; IX - стоп-кодон 1431...1433; X - rrrB 1536...1693; XI - rrrB T2 1834...1861; XII - ген устойчивости к хлорамфениколу 2110...2766; XIII - сайт начала репликации pBR322 2924...3552;

Фиг. 8: Описание вектора рТЗР-751, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. Карта среднекопийного вектора рТЗР-751 (6407 п.о.), кодирующего YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека в одном опероне под контролем промотора уорЕ I - область промотора araBAD 4...279; II - PBAD 250...277; III - MCS I 317...331; IV - SycE 339...731; V - YopE₁₋₁₃₈ 924...1337; VI - домены RigI-CARD человека, заканчивающиеся стоп-кодоном 1350...2087; VII - уорЕ₁₋₁₃₈ (с измененными кодонами) 2101...2514; VIII - h_cGAS₁₆₁₋₅₂₂, заканчивающийся стоп-кодоном 2527...3614; IX - маркер Mус 3626...3655; X - маркер 6x his 3671...3688; XI - третий стоп-кодон 3689...3691; XII - gmB 3794...3951; XIII - gmB T2 4092...4119; XIV - ген устойчивости к хлорамфениколу 4368...5024; XV - сайт начала репликации pBR322 5182...5810;

Фиг. 9: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6, обработанных *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, либо антителом против PD-1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6 посредством внутриопухоловой (в/о) инъекции вводили $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ mRIG-I под контролем промотора уорЕ) или стерильный PBS в качестве контроля. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (10 мг/кг на инъекцию) или стерильный PBS в качестве контроля. Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 60-130 мм³ (средний размер 92 ± 19 мм³). Указан средний объем опухоли (I, n=15 животных на группу) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д5, д6, д10 и д11, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11. Данные отображали до тех пор, пока в каждой группе не оставалось в живых менее 50% исходных мышей.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): V - PBS + PBS; VI - *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; VII - PBS + антитело против PD-1; VIII - *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1

Фиг. 10: Прогрессирование опухоли у контрольной группы мышей Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили стерильный PBS. Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 60-130 мм³ (средний размер 92 +/-19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д5, д6, д10 и д11, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 11: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT-6, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили стерильный PBS. Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 60-130 мм³ (средний размер 92 +/-19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д5, д6, д10 и д11, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 12: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6, обработанных антителом против PD-1. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (10 мг/кг на инъекцию). Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 60-130 мм³ (средний размер 92 +/-19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о

обработку (III) выполняли в д0, д1, д5, д6, д10 и д11, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 13: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6, обработанных комбинацией *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, и антитела против PD-1. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6 посредством внутриопухоловой (в/о) инъекции вводили $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (10 мг/кг на инъекцию). Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 60-130 мм³ (средний размер 92 ± 19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д5, д6, д10 и д11, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 14: Вероятность выживания мышей Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6, обработанных *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, либо антителом против PD-1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы EMT-6 посредством внутриопухоловой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (10 мг/кг на инъекцию) или стерильный PBS в качестве контроля. Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 60-130 мм³ (средний размер 92 ± 19 мм³).

Представлена вероятность выживания (I, %) для каждой группы в течение нескольких суток (II). День первой обработки задавали как день 0, в/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д5, д6, д10 и д11, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б

обработка): V - PBS + PBS; VI - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; VII - PBS + антитело против PD-1; VIII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1.

Фиг. 15: Прогрессирование опухоли у наивных либо ранее испытывавших полную или частичную регрессию опухоли мышей Balb/c дикого типа вызывали/повторно вызывали путем п/к аллотрансплантации клеток рака молочной железы ЕМТ-6.

Наивным либо всем выжившим мышам Balb/c дикого типа, у которых первые опухоли ЕМТ6 являлись необнаружимыми (0 мм³) либо характеризовались размером менее 25 мм, вводили/повторно вводили путем п/к аллотрансплантации клетки рака молочной железы ЕМТ-6 в противоположный бок. Указан средний объем опухоли (I) на противоположном боку (повторно вызванной опухоли) в мм³. День первой обработки задавали как день 0, повторное введение клеток происходило в 66 день (III). Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): IV - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS (N=4); V - PBS + антитело против PD-1 (N=1); VI - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1 (N=7); VII - наивные мыши (N=10).

Фиг. 16: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, либо антителом против PD-1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 или стерильный PBS в качестве контроля. Данные отображали до тех пор, пока в каждой группе не оставалось в живых менее 50% исходных мышей.

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 71 +/- 25 мм³). Указан средний объем опухоли (I) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью

штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, дб и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): V - PBS + PBS; VI - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; VII - PBS + антитело против PD-1; VIII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1.

Фиг. 17: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, либо антителом против CTLA-4, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против CTLA-4 (10 мг/кг на инъекцию) или стерильный PBS в качестве контроля. Данные отображали до тех пор, пока в каждой группе не оставалось в живых менее 50% исходных мышей.

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 71 +/- 25 мм³). Указан средний объем опухоли (I) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, дб и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): V - PBS + PBS; VI - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; VII - PBS + антитело против CTLA-4; VIII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против CTLA-4.

Фиг. 18: Прогрессирование опухоли у контрольной группы мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили стерильный PBS. Инъекции

начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 71 +/-25 мм³).
 Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки
 задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с
 помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б
 5 обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 19: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши.

Мышам C57BL/6J дикого
 типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством
 10 внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ,
 кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе
 (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В
 комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили стерильный PBS. Инъекции
 начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 71 +/-25 мм³).
 15 Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки
 задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с
 помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б
 обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 20: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных антителом против PD-1.

Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы
 B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В
 комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (10 мг/кг на
 инъекцию). Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний
 25 размер 71 +/-25 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³.
 День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение
 следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в
 д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 21: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных антителом против CTLA-4.

Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы
 B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В

комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против CTLA-4 (10 мг/кг на инъекцию). Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 71 +/-25 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 22: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных комбинацией *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, и антитела

против PD-1. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (10 мг/кг на инъекцию). Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 71 +/-25 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 23: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных комбинацией *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, и антитела

против CTLA-4. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против CTLA-4 (10 мг/кг на инъекцию). Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 71 +/-25 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о

обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Фиг. 24: Вероятность выживания мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, либо антителом против PD-1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухоловой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (10 мг/кг на инъекцию) или стерильный PBS в качестве контроля. Представлена вероятность выживания (I, %) для каждой группы в течение нескольких суток (II). День первой обработки задавали как день 0, в/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): V - PBS + PBS; VI - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; VII - PBS + антитело против PD-1; VIII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1.

Фиг. 25: Вероятность выживания мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, либо антителом против CTLA-4, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухоловой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против CTLA-4 (10 мг/кг на инъекцию) или стерильный PBS в качестве контроля. Представлена вероятность выживания (I, %) для каждой группы в течение нескольких суток (II). День первой обработки задавали как день 0, в/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д7 и д11.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): V - PBS + PBS; VI - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; VII - PBS + антитело против CTLA-4; VIII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против CTLA-4.

5 **Фиг. 26: Прогрессирование опухоли у контрольной группы мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10.** Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутривенной (в/в) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили контрольный IgG (10 мг/кг на инъекцию).

10 Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 40-120 мм³ (средний размер 66 +/- 22 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/в обработку (III) выполняли в д0, д2, д4, д6, д9, д13, д16, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д6 и д9. * 5 мышей умерщвляли в д10

15 **Фиг. 27: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши.** Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутривенной (в/в) инъекции вводили 1x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили контрольный IgG (10 мг/кг на инъекцию).

20 Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 40-120 мм³ (средний размер 66 +/- 22 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/в обработку (III) выполняли в д0, д2, д4, д6, д9, д13, д16, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д6 и д9. * 5 мышей умерщвляли в д10

25 **Фиг. 28: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных антителом против PD-1.** Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутривенной (в/в) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1.

30

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 40-120 мм³ (средний размер 66 +/- 22 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/в обработку (III) выполняли в д0, д2, д4, д6, д9, д13, д16, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д6 и д9. * 5 мышей умерщвляли в д10

Фиг. 29: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных комбинацией *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, и антитела против PD-1. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутривенной (в/в) инъекции вводили 1x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1. Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 40-120 мм³ (средний размер 66 +/-22 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 15) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/в обработку (III) выполняли в д0, д2, д4, д6, д9, д13, д16 и д20, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д6 и д9.* 5 мышей умерщвляли в д10

Фиг. 30: Вероятность выживания мышей C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, либо антителом против PD-1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутривенной (в/в) инъекции вводили стерильный PBS или 1x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 или контрольный IgG (10 мг/кг на инъекцию). Представлена вероятность выживания (I, %) для каждой группы в течение нескольких суток (II). День первой обработки задавали как день 0. В/в обработку (III) выполняли в д0, д2, д4, д6, д9, д13, д16 и д20, а в/б обработку (IV) выполняли в д0, д4, д6 и д9.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/в обработка + в/б обработка): V - PBS + контрольный IgG; VI - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + контрольный IgG; VII - PBS + антитело против PD-1; VIII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1. * 5 мышей в группе умерщвляли в д10 и, таким образом, не рассматривали в этих расчетах.

Фиг. 31: Доставка белка, индуцирующего ИФН I типа и кодируемого среднекопийным вектором. Доставка CARD₂ RIG-I человека или CARD₂ RIG-I мыши приводит к индукции сигнального пути ИФН I типа в меланоцитах B16F1. ИФН-репортерные клетки B16F1 инфицировали контрольным штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, не осуществляющим доставку полезной нагрузки (III), либо *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, несущим среднекопийный вектор, кодирующий IV: YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека, V: YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам, выполняли для каждого штамма; титр обозначен на I как множественность заражения (МЗ). Стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (II: ОП₆₅₀), находящейся под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 32: Среднее прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, либо антителом против PD-1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки CT26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека как на pYV, так и на среднекопийном векторе (где YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека кодируются в виде оперона под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (IgG2a крысы, 10 мг/кг на инъекцию) и, в соответствующих случаях, контрольный изотипический IgG2a и/или контрольный изотипический IgG2b.

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/-

19 мм³). Указан средний объем опухоли (I) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, в/б обработку IgG2a (IV) выполняли в д0, д4, д8 и д12, обработку IgG2b (V) выполняли в д0, д2, д4, д6, д8, д10, д12 и д14. Данные отображали до тех пор, пока в каждой группе не оставалось в живых менее 60% исходных мышей.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): VI - PBS + контрольный изотипический IgG2a + контрольный изотипический IgG2b; VII - *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + контрольный изотипический IgG2b; VIII - PBS + антитело против PD-1; IX - *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + антитело против PD-1, 13 животных на группу.

Фиг. 33: Среднее прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26, обработанных *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, либо антителом против PD-L1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки CT26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека как на pYV, так и на среднекопийном векторе (где YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека кодируются в виде оперона под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-L1 (IgG2b крысы, 10 мг/кг на инъекцию) или контрольный изотипический IgG2b и, в соответствующих случаях, контрольный изотипический IgG2a. Данные отображали до тех пор, пока в каждой группе не оставалось в живых менее 60% исходных мышей.

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указан средний объем опухоли (I) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, в/б обработку IgG2a (IV) выполняли в д0, д4, д8 и д12, обработку IgG2b (V) выполняли в

д0, д2, д4, д6, д8, д10, д12 и д14.

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): VI - PBS + контрольный изотипический IgG2a + контрольный изотипический IgG2b; VII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + контрольный изотипический IgG2b; VIII - PBS + антитело против PD-L1; IX - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + антитело против PD-L1, 13 животных на группу.

Фиг. 34: Прогрессирование опухоли у контрольной группы мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки СТ26. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки СТ26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили контрольные изотипические IgG2a и IgG2b (10 мг/кг на инъекцию).

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 13) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, в/б обработку IgG2a (IV) выполняли в д0, д4, д8 и д12, а в/б обработку IgG2b (V) выполняли в д0, д2, д4, д6, д8, д10, д12 и д14.

Фиг. 35: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки СТ26 в группе, обработанной *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки СТ26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека как на pYV, так и на среднекопийном векторе (где YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека кодируются в виде оперона под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили контрольные изотипические IgG2b.

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 13) в мм³. День первой

обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. в/б обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, а в/б обработку IgG2b (IV) выполняли в д0, д2, д4, д6, д8, д10, д12 и д14.

Фиг. 36: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26 в группе, обработанной антителом против PD-1. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки CT26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (IgG2a крысы, 10 мг/кг на инъекцию).

5
10 Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 13) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. в/б обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, а в/б обработку IgG2a против PD-1 (IV) выполняли в д0, д4, д8 и д12.

15 **Фиг. 37: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26 в группе, обработанной комбинацией *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, и антитела против PD-1.** Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки
20 CT26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека как на pYV, так и на среднекопийном векторе (где YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека кодируются в виде оперона под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили
25 антитело против PD-1 (IgG2a крысы, 10 мг/кг на инъекцию).

30 Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 13) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. в/б обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, а в/б обработку IgG2a против PD-1 (IV) выполняли в д0, д4, д8 и д12.

Фиг. 38: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26 в группе,

обработанной антителом против PD-L1. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки СТ26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS. В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-L1 (IgG2b крысы, 10 мг/кг на инъекцию).

5 Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 13) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. в/б обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, а в/б обработку IgG2b (IV) выполняли в д0, д2, д4, д6, д8, д10, д12 и д14.

10 **Фиг. 39: Прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки СТ26 в группе, обработанной комбинацией *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, и антитела против PD-L1.**

Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки СТ26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили 7,5x10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека как на рYV, так и на среднекопийном векторе (где YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека кодируются в виде оперона под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили

15 антитело против PD-L1 (IgG2b крысы, 10 мг/кг на инъекцию).

Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указан объем опухоли (I) у отдельных животных (n = 13) в мм³. День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. в/б обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и

20 д14, а в/б обработку IgG2b (IV) выполняли в д0, д2, д4, д6, д8, д10, д12 и д14.

Фиг. 40: Оптимальный эффект ингибирования роста опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки СТ26 в группах, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, и/или антителом против

30 **PD-1.** Ингибирование роста опухоли (T/C%, I) определяли как отношение медианных объемов опухоли у обработанных животных к медианным объемам опухоли у контрольных животных (инъекция стерильного PBS/контрольных изотипических IgG).

Оптимальное значение представляло собой минимальное отношение Т/С%, отражающее максимальное достигнутое ингибирование роста опухоли. Указано количество живых мышей (II) в каждый рассматриваемый оптимальный день (III). Отношения Т/С% классифицировали следующим образом: 60-100% - отсутствие

5 противоопухолевой активности (IV), 30-60% - пограничная противоопухолевая активность (V), 10-30% - умеренная противоопухолевая активность (VI), 0-10% - выраженная противоопухолевая активность (VII).

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): VIII - PBS + контрольный изотипический IgG2a + контрольный

10 изотипический IgG2b; IX - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD2 RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + контрольный изотипический IgG2b; X - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD2 RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + антитело против PD-1, XI - PBS + антитело против PD-1.

Фиг. 41: Оптимальный эффект ингибирования роста опухоли у мышей Balb/C

15 **дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26 в группах, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD2 RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, и/или антителом против PD-L1.** Ингибирование роста опухоли (Т/С%, I) определяли как отношение медианных объемов опухоли у обработанных животных к медианным объемам опухоли у

20 контрольных животных (инъекция стерильного PBS/контрольных изотипических IgG). Оптимальное значение представляло собой минимальное отношение Т/С%, отражающее максимальное достигнутое ингибирование роста опухоли. Указано количество живых мышей (II) в каждый рассматриваемый оптимальный день (III). Отношения Т/С% классифицировали следующим образом: 60-100% - отсутствие

25 противоопухолевой активности (IV), 30-60% - пограничная противоопухолевая активность (V), 10-30% - умеренная противоопухолевая активность (VI), 0-10% - выраженная противоопухолевая активность (VII).

Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): VIII - PBS + контрольный изотипический IgG2a + контрольный

30 изотипический IgG2b; IX - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD2 RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + контрольный изотипический IgG2b; X - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD2 RIG-I человека и YopE₁₋

138-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + антитело против PD-1, XI - PBS + антитело против PD-1.

Фиг. 42: Вероятность выживания мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26, обработанных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋

5 138-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, либо антителом против PD-L1, либо комбинацией обоих терапевтических средств. Мышам Balb/c дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака толстой кишки CT26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека как на pYV, так и на

10 среднекопийном векторе (где YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека кодируются в виде оперона под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело IgG2b против PD-L1 или изотипический IgG2b и, в соответствующих случаях, контрольный изотипический IgG2a.

15 Инъекции начинали, когда опухоль достигала объема 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³). Указана вероятность выживания (I, %). День первой обработки задавали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (II: дни) с помощью штангенциркуля. В/о обработку (III) выполняли в д0, д1, д3, д6, д10 и д14, в/б обработку IgG2a (IV) выполняли в д0, д4, д8 и д12, обработку IgG2b (V) выполняли в

20 д0, д2, д4, д6, д8, д10, д12 и д14. Группы распределяли следующим образом (показано как: в/о обработка + в/б обработка): VI - PBS + контрольный изотипический IgG2a + контрольный изотипический IgG2b; VII - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + контрольный изотипический IgG2b; VIII - PBS + антитело против PD-L1; IX - *Y. enterocolitica*

25 ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + антитело против PD-L1.

Фиг. 43: Перечень штаммов, используемых в настоящей заявке.

Подробное описание изобретения

30 Как указано выше, в настоящем изобретении предложены фармацевтические комбинации, содержащие рекомбинантный штамм граммотрицательной бактерии и

модулятор иммунной контрольной точки (ICM), пригодные для профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака.

5 Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая:

- а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
 - 10 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
 - (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей.
- 15

С целью интерпретации настоящего описания будут использованы следующие определения, и, в соответствующих случаях, термины, используемые в единственном числе, будут также включать множественное число, и наоборот. Следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации, а не для ограничения.

20

Следует понимать, что признаки, целые числа, характеристики, соединения, описанные в связи с конкретным аспектом, вариантом реализации или примером настоящего изобретения, применимы к любому другому аспекту, варианту реализации или примеру, описанным в настоящем документе, если они не являются несовместимыми с ними. Все признаки, раскрытые в настоящем описании (включая любой пункт прилагаемой формулы изобретения, реферат и чертежи), и/или все этапы любого способа или процесса, описанного таким образом, можно объединять в любой комбинации, за исключением комбинаций, в которых по меньшей мере некоторые из таких признаков и/или этапов являются взаимоисключающими. Настоящее изобретение не ограничивается подробной информацией о любых вышеприведенных вариантах

25

30

реализации.

Термин «содержать» и его варианты, например, «содержит» и «содержащий», обычно используют в значении «включать», т.е., например, «включая, но не ограничиваясь»,
5 иначе говоря, допускает присутствие одного или более свойств или компонентов.

Формы единственного числа включают множественное число, если в содержании явным образом не указано иное.

10 Термин «приблизительно» обозначает диапазон значений $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, формулировка «приблизительно 200» включает $\pm 10\%$ от 200, или от 180 до 220.

Термин «штамм грамтрицательной бактерии» в настоящем документе включает
15 следующие бактерии: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chromobacterium*
20 *violaceum*, *Citrobacter rodentium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Edwardsiella tarda*, *Endozoicomonas elysicola*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Mesorhizobium loti*, *Myxococcus xanthus*, *Pantoea agglomerans*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium temperate*, *Pseudoalteromonas spongiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*,
25 *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium sp*, *Salmonella enterica* и другие *Salmonella sp*, *Shigella flexneri* и другие *Shigella sp*, *Sodalis glossinidius*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campellii*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*,
30 *Yersinia pseudotuberculosis*. Предпочтительными штаммами грамтрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением являются штаммы грамтрицательных бактерий, которые относятся к семействам *Enterobacteriaceae* и

Pseudomonadaceae. Штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением обычно используют для доставки гетерологичных белков с помощью бактериальной T3SS в эукариотические клетки *in vitro* и/или *in vivo*, предпочтительно *in vivo*.

5

Термин «рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии» в настоящем документе обозначает рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, генетически трансформированный полинуклеотидным конструктом, например вектором. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с

10 настоящим изобретением генетически модифицирован посредством трансформации, трансдукции или конъюгации и предпочтительно представляет собой рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, генетически модифицированный посредством трансформации, трансдукции или конъюгации молекулой полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его

15 фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором. Вирулентность такого рекомбинантного штамма грамотрицательной

20 бактерии обычно подавлена посредством делеции бактериальных эффекторных белков, обладающих вирулентной активностью, переносимых одним или более бактериальными белками, являющимися частью аппарата системы секреции. Аппарат системы секреции доставляет такие эффекторные белки в клетки-хозяева, в которых они проявляют свою вирулентную активность в отношении различных белков хозяина

25 и клеточных механизмов. Известно множество различных эффекторных белков, переносимых системами секреции различных типов и демонстрирующих широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Вирулентность рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии в настоящем документе может быть дополнительно подавлена вследствие

30 отсутствия сидерофора, в норме или иногда продуцируемого штаммом грамотрицательной бактерии, в результате чего указанный штамм не продуцирует

- указанный сидерофор, например, является дефектным по продукции указанного сидерофора. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации применяют рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, в котором отсутствует сидерофор, обычно или иногда продуцируемый штаммом грамотрицательной бактерии,
- 5 в результате чего указанный штамм не продуцирует указанный сидерофор, например, является дефектным по продукции указанного сидерофора, более предпочтительно штамм *Yersinia*, в частности *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*uorH,O,P,E,M,T*, *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*uorH,O,P,E,M,T* Δ*HairpinI-virF* или *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*uorH,O,P,E,M,T* Δ*asd pYV-asd*, в которых отсутствует сидерофор, обычно или иногда продуцируемый
- 10 штаммом грамотрицательной бактерии, в результате чего указанный штамм не продуцирует указанный сидерофор, например, является дефектным по продукции указанного сидерофора. В наиболее предпочтительном случае применяют штамм *Yersinia*, в частности *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*uorH,O,P,E,M,T*, в котором отсутствует сидерофор, обычно или иногда продуцируемый штаммом грамотрицательной бактерии,
- 15 в результате чего указанный штамм не продуцирует указанный сидерофор, например, является дефектным по продукции указанного сидерофора, в частности является дефектным по продукции иерсиниабактина. *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*uorH,O,P,E,M,T*, дефектный по продукции иерсиниабактина, описан в публикации WO02077249 и депонирован 24 сентября 2001 года согласно Будапештскому договору о
- 20 международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в Бельгийских согласованных коллекциях микроорганизмов (BCCM); данному штамму был присвоен учетный номер LMG P-21013. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии предпочтительно не продуцирует сидерофор, например, является дефектным по продукции сидерофора.
- 25 Термины «сидерофор», «сидерофор железа» или «хелатор железа», взаимозаменяемо используемые в настоящем документе, обозначают соединения с высоким сродством к железу, например низкомолекулярные соединения с высоким сродством к железу.

Сидерофоры грамотрицательных бактерий представляют собой, например, энтеробактин и дигидроксibenзоилсерин, синтезируемые *Salmonella*, *Escherichia*,

30 *Klebsiella*, *Shigella*, *Serratia* (но используемые всеми энтеробактериями), пиовердины, синтезируемые *Pseudomonas*, вибриобактин, синтезируемый *Vibrio*, ацинетобактин и

ацинетоферрин, синтезируемые *Acinetobacter*, иерсиниабактин и аэробактин, синтезируемые *Yersinia*, орнибактин, синтезируемый *Burkholderia*, сальмохелин, синтезируемый *Salmonella*, аэробактин, синтезируемый *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* и *Yersinia*, алкалагин, синтезируемый *Bordetella*, бизукаберин, синтезируемый *Vibrio*.

- 5 Сидерофоры включают гидроксаматные, катехолатные сидерофоры и сидерофоры со смешанными лигандами. На сегодняшний день несколько сидерофоров одобрены для применения у людей, а именно для лечения перенасыщения железом. Предпочтительными сидерофорами являются дефероксамин (также известный как десферриоксамин В, десфероксамин В, DFO-B, DFOA, DFB или десферал),
 10 десферриоксамин Е, деферазирокс (эксиджад, десирокс, дефриджет, десифер) и деферипрон (феррипрокс).

Термин «эндогенный белок, необходимый для роста», в настоящем документе обозначает белки рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, без которых
 15 указанный штамм грамотрицательной бактерии не может расти. Эндогенные белки, необходимые для роста, представляют собой, например, фермент, необходимый для продукции аминокислоты, фермент, участвующий в биосинтезе пептидогликана, фермент, участвующий в биосинтезе ЛПС, фермент, участвующий в синтезе нуклеотида, или фактор инициации трансляции.

20 Термин «фермент, необходимый для продукции аминокислоты», в настоящем документе обозначает ферменты, связанные с продукцией аминокислот рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии, без которых указанный штамм грамотрицательной бактерии не может расти. Ферменты, необходимые для
 25 продукции аминокислот, представляют собой, например, аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*), глутаминсинтетазу (*glnA*), триптофанил-тРНК-синтетазу (*trpS*) или серингидроксиметилтрансферазу (*glyA*), или транскетолазу 1 (*tktA*), транскетолазу 2 (*tktB*), рибулозофосфат 3-эпимеразу (*rpe*), рибозо-5-фосфатизомеразу А (*rpiA*), трансальдолазу А (*talA*), трансальдолазу В (*talB*),
 30 фосфорибозилпирофосфатсинтазу (*prs*), АТФ-фосфорибозилтрансферазу (*hisG*), бифункциональный белок биосинтеза гистидина HisIE (*hisI*), 1-(5-фосфорибозил)-5-[(5-фосфорибозиламино)метиленамино]имидазол-4-карбоксамидизомеразу (*hisA*),

субъединицу HisH имидазолглицерофосфатсинтазы (hisH), субъединицу HisF
 имидазолглицерофосфатсинтазы (hisF), бифункциональный белок биосинтеза
 гистидина HisB (hisB), гистидинолфосфатаминотрансферазу (hisC),
 гистидинолдегидрогеназу (hisD), 3-дегидрохинатсинтазу (aroB), 3-
 5 дегидрохинатдегидратазу (aroD), шикиматдегидрогеназу (НАДФ(+)) (aroE),
 шикиматкиназу 2 (aroL), шикиматкиназу 1 (aroK), 3-фосфошикимат-1-
 карбоксивинилтрансферазу (aroA), хоризматсинтазу (aroC), Р-белок (pheA), Т-белок
 (tyrA), аминотрансферазу ароматических аминокислот (tyrB), фосфо-2-дегидро-3-
 дезоксигептонатальдотазу (aroG), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдотазу (aroH),
 10 фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдотазу (aroF), хинат/шикиматдегидрогеназу
 (ydiB), АТФ-зависимый изофермент 6-фосфофруктокиназы 1 (pfkA), АТФ-зависимый
 изофермент 6-фосфофруктокиназы 2 (pfkB), фруктозобисфосфатальдотазу 2 класса
 (fbaA), фруктозобисфосфатальдотазу 1 класса (fbaB), триозофосфатизомеразу (tpiA),
 пируваткиназу I (pykF), пируваткиназу II (pykA), глицеральдегид-3-
 15 фосфатдегидрогеназу A (gapA), фосфоглицераткиназу (pgk), 2,3-бисфосфоглицерат-
 зависимую фосфоглицератмутазу (gpmA), 2,3-бисфосфоглицерат-независимую
 фосфоглицератмутазу (gpmM/yibO), предполагаемую фосфоглицератмутазу
 (ytjC/gpmB), енолазу (eno), D-3-фосфоглицератдегидрогеназу (serA),
 фосфосеринаминотрансферазу (serC), фосфосеринфосфатазу (serB), L-сериндегидратазу
 20 1 (sdaA), L-сериндегидратазу 2 (sdaB), катаболическую L-треониндегидратазу (tdcB),
 биосинтетическую L-треониндегидратазу (ilvA), L-сериндегидратазу (tdcG),
 серинацетилтрансферазу (cysE), цистеинсинтазу A (cysK), цистеинсинтазу B (cysM),
 бета-цистатионазу (malY), цистатионин-бета-лиазу (metC), 5-
 метилтетрагидроптероилтриглутаматгомоцистеинметилтрансферазу (metE),
 25 метионинсинтазу (metH), S-аденозилметионинсинтазу (metK), цистатионин-гамма-
 синтазу (metB), гомосерин-О-сукцинилтрансферазу (metA), 5'-метилтиоаденозин/S-
 аденозилгомоцистеиннуклеозидазу (mtnN), S-рибозилгомоцистеинлиазу (luxS),
 цистатион-бета-лиазу, цистатион-гамма-лиазу, серингидроксиметилтрансферазу (glyA),
 глицингидроксиметилтрансферазу (itaE), малую субъединицу 3-
 30 изопропилмалатдегидратазы (leuD), большую субъединицу 3-
 изопропилмалатдегидратазы (leuC), 3-изопропилмалатдегидрогеназу (leuB),
 биосинтетическую L-треониндегидратазу (ilvA), большую субъединицу изофермента 3

ацетолактатсинтазы (*ilvI*), малую субъединицу изофермента 3 ацетолактатсинтазы (*ilvH*), малую субъединицу изофермента 1 ацетолактатсинтазы (*ilvN*), малую субъединицу изофермента 2 ацетолактатсинтазы (*ilvM*), редуктоизомеразу кетокислот (НАДФ(+)) (*ilvC*), дегидратазу дигидроксикислот (*ilvD*), аминотрансферазу аминокислот с разветвленной цепью (*ilvE*), бифункциональную аспартокиназу/гомосериндегидрогеназу 1 (*thrA*), бифункциональную аспартокиназу/гомосериндегидрогеназу 2 (*metL*), 2-изопропилмалатсинтазу (*leuA*), глутаматпируватаминотрансферазу (*alaA*), аспартатаминотрансферазу (*aspC*), бифункциональную аспартокиназу/гомосериндегидрогеназу 1 (*thrA*), бифункциональную аспартокиназу/гомосериндегидрогеназу 2 (*metL*), лизин-чувствительную аспартокиназу 3 (*lysC*), аспаргатполуальдегиддегидрогеназу (*asd*), 2-кето-3-дезоксигалактонатаальдозу (*yagE*), 4-гидрокситетрагидродипиколинатсинтазу (*dapA*), 4-гидрокситетрагидродипиколинатредуктазу (*dapB*), 2,3,4,5-тетрагидропиридин-2,6-дикарбоксилат-N-сукцинилтрансферазу (*dapD*), сукцинилдиаминопимелатдесукцинилазу (*dapE*), диаминопимелатэпимеразу (*dapF*), предполагаемую лиазу (*yjhH*), ацетилорнитин/сукцинилдиаминопимелатаминотрансферазу (*argD*), цитратсинтазу (*gltA*), аконитатгидратазу В (*acnB*), аконитатгидратазу А (*acnA*), неохарактеризованную предполагаемую аконитатгидратазу (*ybhJ*), изоцитратдегидрогеназу (*icd*), аспартатаминотрансферазу (*aspC*), глутаматпируватаминотрансферазу (*alaA*), большую цепь глутаматсинтазы [НАДФН] (*gltB*), малую цепь глутаматсинтазы [НАДФН] (*gltD*), глутаминсинтетазу (*glnA*), ацетилтрансферазу аминокислот (*argA*), ацетилглутаматкиназу (*argB*), N-ацетил-гамма-глутамилфосфатредуктазу (*argC*), ацетилорнитин/сукцинилдиаминопимелатаминотрансферазу (*argD*), ацетилорнитиндеацетилазу (*argE*), цепь F орнитинкарбамоилтрансферазы (*argF*), цепь I орнитинкарбамоилтрансферазы (*argI*), аргининосукцинатсинтазу (*argG*), аргининосукцинатлиазу (*argH*), глутамат-5-киназу (*proB*), гамма-глутамилфосфатредуктазу (*proA*), пирролин-5-карбоксилатредуктазу (*proC*), орнитинциклодеаминазу, лейцин-тРНК-лигазу (*leuS*), глутамин-тРНК-лигазу (*glnS*), серин-тРНК-лигазу (*serS*), бета-субъединицу глицин-тРНК лигазы (*glyS*), альфа-субъединицу глицин-тРНК-лигазы (*glyQ*), тирозин-тРНК-лигазу (*tyrS*), треонин-тРНК-лигазу (*thrS*), альфа-субъединицу фенилаланин-тРНК-лигазы (*pheS*), бета-субъединицу

фенилаланин-тРНК-лигазы (pheT), аргинин-тРНК-лигазу (argS), гистидин-тРНК-лигазу (hisS), валин-тРНК-лигазу (valS), аланин-тРНК-лигазу (alaS), изолейцин-тРНК-лигазу (ileS), пролин-тРНК-лигазу (proS), цистеин-тРНК-лигазу (cysS), аспарагин-тРНК-лигазу (asnS), аспарат-тРНК-лигазу (aspS), глутамат-тРНК-лигазу (gltX), триптофан-тРНК-лигазу (trpS), бета-субъединицу глицин-тРНК лигазы (glyS), метионин-тРНК-лигазу (metG), лизин-тРНК-лигазу (lysS). Предпочтительные ферменты, необходимые для
 5 продукции аминокислот, представляют собой tktA, gpe, prs, aroK, tyrB, aroH, fbaA, gapA, pgk, eno, tdcG, cysE, metK, glyA, asd, dapA/B/D/E/F, argC, proC, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG,
 10 lysS, более предпочтительные ферменты представляют собой asd, glyA, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS, наиболее предпочтительный фермент представляет собой asd.

Термины «штамм грамотрицательной бактерии, дефектный по продукции
 15 аминокислоты, необходимой для роста», и «ауксотрофный мутант» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают штаммы грамотрицательных бактерий, которые не могут расти при отсутствии по меньшей мере одной экзогенно обеспечиваемой незаменимой аминокислоты или ее предшественника. Аминокислота, по продукции которой штамм является дефектным, представляет собой, например,
 20 аспарат, *мезо*-2,6-диаминопимелиновую кислоту, ароматические аминокислоты или лейцин-аргинин. Такой штамм можно получить, например, в результате делеции гена аспарат-бета-полуальдегиддегидрогеназы (Δ asd). Такой ауксотрофный мутант не может расти при отсутствии экзогенной *мезо*-2,6-диаминопимелиновой кислоты. Мутация, например, делеция гена аспарат-бета-полуальдегиддегидрогеназы, является
 25 в настоящем документе предпочтительной для штамма грамотрицательной бактерии, дефектного по продукции аминокислоты, необходимой для роста, в соответствии с настоящим изобретением.

Термин «штамм грамотрицательной бактерии, дефектный по продукции белков
 30 адгезии, связывающихся с поверхностью эукариотической клетки или внеклеточным матриксом», обозначает мутантные штаммы грамотрицательных бактерий, которые не экспрессируют по меньшей мере один белок адгезии по сравнению с белками адгезии,

экспрессируемыми соответствующим штаммом дикого типа. Белки адгезии могут включать, например, протяженные полимерные молекулы адгезии, например, пили/фимбрии, или нефимбриальные адгезины. Фимбриальные адгезины включают пили 1 типа (например, Fim-пили *E. coli* с адгезином FimH), P-пили (например, Pap-пили с адгезином PapG *E. coli*), пили 4 типа (например, белок пилин, например, *P. aeruginosa*) или карлин (белки Csg с адгезином CsgA *S. enterica*). Нефимбриальные адгезины включают тримерные адгезины-ауто транспортеры, например, YadA *Y. enterocolitica*, ВраА (*B. pseudomallei*), Ниа (*H. influenzae*), BadA (*B. henselae*), NadA (*N. meningitidis*) или UspA1 (*M. catarrhalis*), а также другие адгезины-ауто транспортеры, например, AIDA-1 (*E. coli*), а также другие адгезины/инвазины, например, InvA *Y. enterocolitica* или интимин (*E. coli*), либо члены семейства Dr или семейства Afa (*E. coli*). Термины YadA и InvA в настоящем документе обозначают белки *Y. enterocolitica*. Ауто транспортер YadA (Skumik and Wolf-Watz, 1989) связывается с различными формами коллагена, а также фибронектином, в то время как инвазин InvA (Isberg et al., 1987) связывается с β -интегринами в мембране эукариотической клетки. Если штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Y. enterocolitica*, то указанный штамм, предпочтительно, является дефектным по InvA и/или YadA.

В настоящем документе термин «семейство *Enterobacteriaceae*» включает семейство грамотрицательных палочкообразных факультативно анаэробных бактерий, обнаруживаемых в почве, воде, организмах растений и животных, которые часто присутствуют у позвоночных в качестве патогенов. Бактерии данного семейства характеризуются сходной физиологией и демонстрируют консервативность функциональных элементов и генов в составе своих геномов. Также, будучи отрицательными по оксидазе, все члены данного семейства сбраживают глюкозу, и большинство из них способны восстанавливать нитрат.

Бактерии *Enterobacteriaceae* в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой любую бактерию из данного семейства и конкретно включают бактерии следующих родов: *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Morganella*, *Providencia* или *Yersinia*, но не ограничиваются ими. В более конкретных вариантах реализации указанная бактерия относится к виду *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*,

Escherichia hermannii, *Escherichia vulneris*, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri*, *Providencia alcalifaciens* или *Morganella morganii*.

Штамм грамотрицательной бактерии предпочтительно выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium*, *Sodalis*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Rhizobiae*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Bordetella* и *Desulfovibrio*, более предпочтительно - из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*, наиболее предпочтительно - из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*, в частности *Yersinia*.

15 Термин «*Yersinia*» в настоящем документе включает все виды *Yersinia*, включая *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*. Предпочтительным является *Yersinia enterocolitica*.

20 Термин «*Salmonella*» в настоящем документе включает все виды *Salmonella*, включая *Salmonella enterica* и *S. bongori*. Предпочтительным является *Salmonella enterica*.

«Промотор» в настоящем документе обозначает нуклеотидную последовательность, регулируемую экспрессию единицы транскрипции. «Область промотора» представляет собой регуляторную область, способную связываться с РНК-полимеразой в клетке и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности, расположенной по ходу транскрипции (в 3'-направлении). В области промотора находится сайт инициации транскрипции (который обычно определяют посредством картирования с помощью нуклеазы S1), а также белок-связывающие домены (консенсусные последовательности), отвечающие за связывание РНК-полимеразы, например предполагаемая область -35 и бокс Прибнова. Термин «функционально связанный» при описании взаимодействия между двумя нуклеотидами, например областями ДНК, обозначает ничто иное как то,

что данные участки функционально связаны друг с другом и расположены на одном и том же фрагменте нуклеиновой кислоты. Промотор функционально связан со структурным геном, если он контролирует транскрипцию этого гена и расположен на том же фрагменте нуклеиновой кислоты, что и этот ген. Обычно промотор является функциональным в указанном штамме грамотрицательной бактерии, т.е. промотор способен экспрессировать гибридный белок в соответствии с настоящим изобретением, т.е. промотор способен экспрессировать гибридный белок в соответствии с настоящим изобретением без дополнительного применения генетической инженерии или экспрессии дополнительных белков. Более того, функциональный промотор в природе не должен быть антагонистичен по отношению к бактериальной T3SS.

Термин «внехромосомный генетический элемент» в настоящем документе обозначает генетический элемент, отличный от хромосомы, который эндогенно несет штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением, например плазмиду вирулентности, или который представляет собой экзогенный генетический элемент, которым трансформирован штамм грамотрицательной бактерии и который временно или стабильно встроен в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, который эндогенно несет бактерия, например, эндогенную плазмиду вирулентности. Эндогенная плазида вирулентности является предпочтительным внехромосомным генетическим элементом в соответствии с настоящим изобретением. Такой внехромосомный генетический элемент можно получить путем встраивания вектора, например, экспрессирующего вектора, вектора для гомологичной рекомбинации, или другого встраивания в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, который эндогенно несет бактерия, например, плазмиду вирулентности, путем встраивания фрагментов ДНК для гомологичной рекомбинации или другого встраивания в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, который эндогенно несет бактерия, например, плазмиду вирулентности, или посредством направляемой РНК-элементом сайт-специфической инсерции в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, который эндогенно несет бактерия, например плазида вирулентности, например с помощью CRISPR/Cas9 и соответствующей направляющей РНК.

Термины «молекула полинуклеиновой кислоты» и «молекула полинуклеотида» используются в настоящем документе взаимозаменяемо, имеют одинаковое значение и обозначают как молекулы ДНК, так и молекулы РНК, которые могут быть одноцепочечными либо двуцепочечными, и которые могут частично или полностью транскрибироваться и транслироваться (ДНК) или частично или полностью транслироваться (РНК) в продукт гена.

Термины «последовательность нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность» и «последовательность нуклеотидной кислоты» используются в настоящем документе взаимозаменяемо, имеют одинаковое значение и предпочтительно обозначают ДНК или РНК. Термины «последовательность нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность» и «последовательность нуклеотидной кислоты» предпочтительно используются как синонимы термина «последовательность полинуклеотида».

Термин «оперон» в настоящем документе обозначает два или более генов, транскрибируемых под контролем одного промотора. Таким образом, эти гены, как правило, транскрибируются вместе и образуют одну матричную РНК, после чего эта единая мРНК кодирует более чем один белок (полицистронная мРНК). В дополнение к промотору и двум или более генам также может присутствовать элемент оператора, который контролирует транскрипцию.

Термин «доставка» в настоящем документе обозначает транспортировку белка из рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии в эукариотическую клетку, включая этапы экспрессии гетерологичного белка в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии, секрецию экспрессированного белка или белков из такого рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии и транслокацию секретированного белка или белков таким рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии в цитозоль эукариотической клетки. Соответственно, термины «сигнал доставки» или «сигнал секреции», взаимозаменяемо используемые в настоящем документе, обозначают полипептидную последовательность, которую может распознавать система секреции и транслокации штамма грамотрицательной бактерии и которая направляет доставку белка из штамма грамотрицательной бактерии

в

эукариотические

клетки.

Термин «сигнал доставки из бактериального эффекторного белка» в настоящем документе обозначает сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функциональный в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии, т.е. обеспечивающий секрецию экспрессированного в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии гетерологичного белка из такого рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с помощью системы секреции, например системы секреции III типа, IV типа или VI типа, или транслокацию экспрессированного в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии гетерологичного белка таким рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии в цитозоль эукариотической клетки с помощью системы секреции, например, системы секреции III типа, IV типа или VI типа. Термин «сигнал доставки из бактериального эффекторного белка» в настоящем документе также включает фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, т.е. укороченные версии сигнала доставки, например сигнал доставки, содержащий до 10, предпочтительно до 20, более предпочтительно до 50, еще более предпочтительно до 100, в частности до 140 аминокислот сигнала доставки, например природного сигнала доставки. Таким образом, нуклеотидная последовательность, например, последовательность ДНК, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, может кодировать полноразмерный сигнал доставки или его фрагмент, причем указанный фрагмент обычно содержит до 30, предпочтительно до 60, более предпочтительно до 150, еще более предпочтительно до 300, в частности до 420 нуклеиновых кислот.

В настоящем документе «секреция» белка обозначает транспортировку гетерологичного белка наружу через мембрану клетки рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии. «Транслокация» белка обозначает транспортировку гетерологичного белка из рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии через плазматическую мембрану эукариотической клетки в цитозоль такой эукариотической клетки.

30

Термин «бактериальный белок, являющийся частью аппарата системы секреции», в настоящем документе обозначает бактериальные белки, образующие важные

компоненты бактериальной системы секреции 3 типа (Т3SS), системы секреции 4 типа (Т4SS) и системы секреции 6 типа (Т6SS), предпочтительно Т3SS. Без таких белков соответствующая система секреции нефункциональна в отношении транслокации белков в клетки-хозяева, даже если по-прежнему кодируются и продуцируются все
5 другие компоненты системы секреции и бактериальный эффекторный белок, подлежащий транслокации.

Термин «бактериальный эффекторный белок» в настоящем документе обозначает бактериальные белки, транспортируемые системами секреции, например
10 бактериальными белками, являющимися частью аппарата системы секреции, в клетки-хозяева. Такие эффекторные белки доставляются посредством системы секреции в клетку-хозяина, в которой они проявляют, например, вирулентную активность в отношении различных белков и клеточных механизмов хозяина. Известно множество различных эффекторных белков, переносимых системами секреции различных типов и
15 демонстрирующих широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 3 типа (Т3SS), систему секреции 4 типа (Т4SS) и систему секреции 6 типа (Т6SS). Некоторые эффекторные белки (например, IpaC *Shigella flexneri*) также относятся к классу бактериальных белков, являющихся частью аппарата системы
20 секреции и обеспечивающих транслокацию белка. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии в настоящем документе обычно содержит бактериальные белки, представляющие собой важнейшие компоненты бактериальной системы секреции 3 типа (Т3SS), системы секреции 4 типа (Т4SS) и/или системы секреции 6 типа (Т6SS), предпочтительно системы секреции 3 типа (Т3SS). Бактериальные
25 эффекторные белки рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением обычно представляют собой бактериальные эффекторные белки Т3SS, бактериальные эффекторные белки Т4SS или бактериальные эффекторные белки Т6SS, предпочтительно бактериальные эффекторные белки Т3SS.

30 Термин «бактериальные белки, представляющие собой важнейшие компоненты бактериальной Т3SS», в настоящем документе обозначает белки, которые в природе образуют инъектисому, например впрыскивающую иглу, или иным образом

необходимы для ее функционирования при транслокации белков в эукариотические клетки. Белки, образующие инъектисому или иным образом необходимые для функционирования системы секреции при транслокации белков в эукариотические клетки, включают, без ограничения:

- 5 SctC, YscC, MxiD, InvG, SsaC, EscC, HrcC, HrcC (секретин), SctD, YscD, MxiG, Prg, SsaD, EscD, HrpQ, HrpW, FliG (наружный белок MS-кольца), SctJ, YscJ, MxiJ, PrgK, SsaJ, EscJ, HrcJ, HrcJ, FliF (внутренний белок MS-кольца), SctR, YscR, Spa24, SpaP, SpaP, SsaR, EscR, HrcR, HrcR, FliP (минорный белок аппарата экспорта), SctS, YscS, Spa9 (SpaQ), SpaQ, SsaS, EscS, HrcS, HrcS, FliQ (минорный белок аппарата экспорта),
- 10 SctT, YscT, Spa29 (SpaR), SpaR, SsaT, EscT, HrcT, HrcT, FliR (минорный белок аппарата экспорта), SctU, YscU, Spa40, SpaS, SpaS, SsaU, EscU, HrcU, HrcU, FlhB (белок-переключатель аппарата экспорта), SctV, YscV, MxiA, InvA, SsaV, EscV, HrcV, HrcV, FlhA (основной белок аппарата экспорта), SctK, YscK, MxiK, OrgA, HrpD (вспомогательный цитозольный белок), SctQ, YscQ, Spa33, SpaO, SpaO, SsaQ, EscQ,
- 15 HrcQA+B, HrcQ, FliM + FliN (белок C-кольца), SctL, YscL, MxiN, OrgB, SsaK, EscL, Orf5, HrpE, HrpF, FliH (статор), SctN, YscN, Spa47, SpaL, InvC, SsaN, EscN, HrcN, HrcN, FliI (АТФаза), SctO, YscO, Spa13, SpaM, InvI, SsaO, Orf15, HrpO, HrpD, FliJ (стебель), SctF, YscF, MxiH, PrgI, SsaG, EscF, HrpA, HrpY (белок филамента иглы), SctI, YscI, MxiI, PrgJ, SsaI, EscI, rOrf8, HrpB, HrpJ, (внутренний белок стержня), SctP, YscP, Spa32,
- 20 SpaN, InvJ, SsaP, EscP, Orf16, HrpP, HraP, FliK (регулятор длины иглы), LcrV, IpaD, SipD (гидрофильный транслокатор, белок кончика иглы), YopB, IpaB, SipB, SseC, EspD, HrpK, PopF1, PopF2 (гидрофобный транслокатор, белок поры), YopD, IpaC, SipC, SseD, EspB (гидрофобный транслокатор, белок поры), YscW, MxiM, InvH (пилотин), SctW, YopN, MxiC, InvE, SsaL, SepL, HrpJ, HraA (привратник).

25

Термин «эффекторный белок T6SS» или «эффекторный белок бактериальной T6SS» в настоящем документе обозначает белки, которые системы T6S вводят в цитозоль эукариотических клеток или бактерий в естественных условиях, и белки, которые системы T6S секретируют в естественных условиях и которые могут, например,

30 образовывать транслокационные поры в эукариотической мембране. Термин «эффекторный белок T4SS» или «эффекторный белок бактериальной T4SS» в настоящем документе обозначает белки, которые системы T4S вводят в цитозоль

эукариотических клеток в естественных условиях, и белки, которые системы T4S
 секретируют в естественных условиях и которые могут, например, образовывать
 транслокационную пору в эукариотической мембране. Термин «эффекторный белок
 T3SS» или «эффекторный белок бактериальной T3SS» в настоящем документе
 5 обозначает белки, которые системы T3S вводят в цитозоль эукариотических клеток в
 естественных условиях, и белки, которые системы T3S секретируют в естественных
 условиях и которые могут, например, образовывать транслокационную пору в
 эукариотической мембране (включая порообразующие транслокаторы (например, YopB
 и YopD *Yersinia*) и белки кончика, например, LcrV *Yersinia*). Предпочтительно
 10 применяют белки, которые системы T3S вводят в цитозоль эукариотических клеток в
 естественных условиях. Данные факторы вирулентности парализуют или
 перепрограммируют эукариотическую клетку с пользой для патогена. Эффекторы T3S
 демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулируют
 функцию критических регуляторных молекул хозяина и включают AvrA, AvrB, AvrBs2,
 15 AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto,
 AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB,
 GtgA, GtgE, GALA family of proteins, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1,
 HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaB, IpaC, IpaH,
 IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB,
 20 PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC,
 SipD/SspD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC,
 SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL,
 SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD,
 YopB, YopD YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA, но не
 25 ограничиваются ими.

Термин «рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, накапливающийся в
 злокачественной солидной опухоли», или «рекомбинантный штамм грамотрицательной
 бактерии накапливается в злокачественной солидной опухоли» в настоящем документе
 30 относится к рекомбинантному штамму грамотрицательной бактерии, который
 реплицируется в злокачественной солидной опухоли, тем самым увеличивая количество
 бактерий данного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии внутри

злокачественной солидной опухоли. Неожиданно обнаружили, что рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии после введения субъекту специфично накапливается в злокачественной солидной опухоли, т.е. специфично накапливается в органе, в котором присутствует злокачественная опухоль, причем количество бактерий

5 указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии в органах, в которых отсутствует злокачественная солидная опухоль, является низким или необнаружимым. В случае бактерий, локализующихся вне клетки, например *Yersinia*, указанные бактерии преимущественно накапливаются в межклеточном пространстве, образованном между опухолевыми клетками или клетками микроокружения опухоли.

10 Бактерии, растущие внутри клеток, например *Salmonella*, должны внедряться в основном в опухолевые клетки или клетки микроокружения опухоли и обитать внутри таких клеток, хотя могут наблюдаться и внеклеточные скопления бактерий. Количество бактерий указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, накопившихся внутри злокачественной солидной опухоли, может находиться,

15 например, в диапазоне от 10^4 до 10^9 бактерий на грамм опухолевой ткани.

Термин «рак» в настоящем документе относится к заболеванию, при котором аномальные клетки бесконтрольно делятся и могут прорасти в близлежащие ткани. Раковые клетки могут также распространяться в другие части тела через кровеносную и

20 лимфатическую системы. Существует несколько основных видов рака. Карцинома представляет собой рак, который возникает в коже или тканях, выстилающих или покрывающих внутренние органы. Саркома представляет собой рак, который возникает в кости, хряще, жире, мышцах, кровеносных сосудах или другой соединительной или поддерживающей ткани. Лейкоз представляет собой рак, который возникает в

25 кроветворной ткани, например костном мозге, и вызывает образование и поступление в кровь большого количества аномальных клеток крови. Лимфома и множественная миелома представляют собой злокачественные новообразования, которые возникают в клетках иммунной системы. Злокачественные новообразования центральной нервной системы представляют собой злокачественные новообразования, которые возникают в

30 тканях головного и спинного мозга. Термин «рак» в настоящем документе включает солидные опухоли, т.е. злокачественные солидные опухоли, например саркомы, карциномы и лимфомы, и несолидные опухоли, например лейкозы (злокачественные

заболевания крови). Солидные опухоли являются предпочтительными.

Термин «солидная опухоль» или «признак солидной опухоли» в настоящем документе обозначает патологическое скопление ткани, обычно не содержащее кист или жидких областей. Солидные опухоли могут являться доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми). Злокачественные солидные опухоли предпочтительно лечат способами в соответствии с настоящим изобретением. Термин «злокачественная солидная опухоль» или «признак злокачественной солидной опухоли» в настоящем документе обозначает патологическое скопление ткани, обычно не содержащее кист или жидких областей. Различные виды злокачественных солидных опухолей называют по типу клеток, которые их образуют. Примерами злокачественных солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (злокачественные заболевания крови) обычно не образуют злокачественных солидных опухолей (по определению Национального института рака Национального института здравоохранения США).

Злокачественные солидные опухоли включают, без ограничения, патологическое скопление клеток, которые могут происходить из тканей различных типов, например печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишки, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичка, щитовидной железы или легкого и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишок, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичек, щитовидной железы или легкого.

Предпочтительные злокачественные солидные опухоли, которые можно лечить способами в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой злокачественные солидные опухоли, происходящие из кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки. В равной степени предпочтительными злокачественными солидными опухолями, которые можно лечить способами в соответствии с настоящим

изобретением, являются злокачественные солидные опухоли, ассоциированные с раком печени, например гепатоцеллюлярная карцинома.

- 5 Термин «частота объективного ответа» (ЧОО) в настоящей заявке обозначает долю пациентов с уменьшением размера опухоли на заранее установленную величину и за минимальный период времени. Длительность ответа обычно измеряют с момента первоначального ответа до документированного прогрессирования опухоли. В общем случае FDA определяет ЧОО как сумму частичных ответов и полных ответов. При таком определении ЧОО является прямой мерой противоопухолевой активности
- 10 лекарственного средства, которую можно оценить в исследовании с одной группой. ЧОО представляет собой сумму полного ответа (ПО) и частичного ответа (ЧО). Определение ЧОО, ПО и ЧО для человека представлено в руководствах RECIST (RECIST 1.1; (Eisenhauer et al., 2009)) и переработанных руководствах по оценке иммунотерапевтического соединения (iRECIST; (Seymour et al., 2017)).
- 15 В доклинических исследованиях на мышах, несущих опухоли, определение ответа опухоли переработано относительно определения, приведенного в RECIST для человека: отсутствие регрессии опухоли определяют как более чем 35% увеличение объема опухоли по сравнению с соответствующим объемом в день 0; стабильное заболевание определяют как изменение объема опухоли от 50% уменьшения до 35%
- 20 увеличения объема опухоли по сравнению с днем 0; частичную регрессию определяют как 50% - 95% уменьшение объема опухоли по сравнению с днем 0; и полную регрессию или полный ответ определяют как >95% уменьшение объема опухоли по сравнению с днем 0.
- 25 Термины «полный ответ» и «полная регрессия» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и имеют одинаковое значение. Термин «полный ответ» (ПО) в отношении целевых очагов обозначает исчезновение всех целевых очагов. Патологически измененные лимфатические узлы (целевые или нецелевые) должны уменьшиться по короткой оси до < 10 мм. В настоящем документе термин «полный
- 30 ответ» (ПО) в отношении нецелевых очагов обозначает исчезновение всех нецелевых очагов и нормализацию уровня опухолевых маркеров. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (короткая ось < 10 мм).

В настоящем документе термин «частичный ответ» (ЧО) в отношении целевых очагов обозначает по меньшей мере 30% уменьшение суммы диаметров целевых очагов по сравнению с исходной суммой диаметров.

5

В настоящем документе термин «прогрессирующее заболевание» (ПЗ) в отношении целевых очагов обозначает по меньшей мере 20% увеличение суммы диаметров целевых очагов по сравнению с наименьшей суммой за время исследования (включая исходную сумму, если она является наименьшей за время исследования). В дополнение к относительному 20% увеличению указанная сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм. Появление одного или более новых очагов также считается прогрессированием. В настоящем документе термин «прогрессирующее заболевание» (ПЗ) в отношении нецелевых очагов обозначает появление одного или более новых очагов и/или явное прогрессирующее существование существующих нецелевых очагов. Явное прогрессирующее заболевание обычно не должно иметь большее значение, чем статус целевого очага. Оно должно отражать общее изменение статуса заболевания, а не увеличение одного очага.

В настоящем документе термин «стабильное заболевание» (СЗ) в отношении целевых очагов обозначает как отсутствие достаточного уменьшения для соответствия критериям ЧО, так и отсутствие достаточного увеличения для соответствия критериям ПЗ по сравнению с наименьшей суммой диаметров за время исследования.

В настоящем документе термин «выживаемость без прогрессирующего заболевания» (ВБП) относится ко времени от начала лечения до момента прогрессирующего заболевания или смерти, в зависимости от того, какое из этих событий наступит раньше.

В настоящем документе термин «бактериальный эффекторный белок, вирулентный в отношении эукариотических клеток» обозначает бактериальные эффекторные белки, транспортируемые системами секреции в клетки-хозяева, где они проявляют вирулентную активность в отношении различных белков и клеточных механизмов хозяина. Известно множество различных эффекторных белков, переносимых

30

системами секреции различных типов и демонстрирующих широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 3 типа (Т3SS), систему секреции 4 типа (Т4SS) и систему секреции 6 типа (Т6SS). Важно отметить, что некоторые эффекторные белки, вирулентные в отношении эукариотических клеток (например, IpaC *Shigella flexneri*), также относятся к классу бактериальных белков, являющихся частью аппарата системы секреции. Если бактериальный эффекторный белок, вирулентный в отношении эукариотических клеток, также необходим для функционирования аппарата секреции, такой белок исключают из данного определения. Эффекторные белки Т3SS, вирулентные в отношении эукариотических клеток, относятся к таким белкам, как YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT *Y. enterocolitica*, или OspF, IpgD, IpgB1 *Shigella flexneri*, или SopE, SopB, SptP *Salmonella enterica*, или ExoS, ExoT, ExoU, ExoY *P. aeruginosa*, или Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ *E. coli*. Эффекторные белки Т4SS, вирулентные в отношении эукариотических клеток, относятся к таким белкам, как LidA, SidC, SidG, SidH, SdhA, SidJ, SdjA, SdeA, SdeA, SdeC, LepA, LepB, WipA, WipB, YlfA, YlfB, VipA, VipF, VipD, VpdA, VpdB, DrrA, LegL3, LegL5, LegL7, LegLC4, LegLC8, LegC5, LegG2, Ceg10, Ceg23, Ceg29 *Legionella pneumophila*, или BepA, BepB, BepC, BepD, BepE, BepF BepG *Bartonella henselae*, или VirD2, VirE2, VirE3, VirF *Agrobacterium tumefaciens*, или CagA *H. pylori*, или коклюшный токсин *Bordetella pertussis*. Эффекторные белки Т6SS, вирулентные в отношении эукариотических клеток, относятся к таким белкам, как белки VgrG *Vibrio cholerae* (например, VgrG1).

В настоящем документе термин «эффекторный белок Т3SS, вирулентный в отношении эукариотических клеток», или «бактериальный эффекторный белок Т3SS, вирулентный в отношении эукариотических клеток» относится к белкам, которые системы Т3S вводят в цитозоль эукариотических клеток в естественных условиях, и белки, которые системы Т3S секретируют в естественных условиях и которые могут, например, образовывать транслокационную пору в эукариотической мембране и представляют собой факторы вирулентности в отношении эукариотических клеток, т.е. белки, парализующие или перепрограммирующик эукариотическую клетку с пользой для патогена. Эффекторы демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей и модулируют функцию важнейших регуляторных механизмов хозяина, например

фагоцитоза и актинового цитоскелета, воспалительных сигнальных путей, апоптоза, эндоцитоза или секреторных путей (Cornelis, 2006; Mota and Cornelis, 2005), и включают AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphE_{Pto}, AvrPpiB_{Pto}, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, белки семейства GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA, но не ограничиваются ими.

Эффекторные гены T3SS *Yersinia*, вирулентные в отношении эукариотической клетки, которые можно делетировать/мутировать, например в *Y. enterocolitica*, представляют собой YopE, YopH, YopM, YopO, YopP (также известный под названием YopJ) и YopT (Trosky et al., 2008). Соответствующие эффекторные гены, вирулентные в отношении эукариотической клетки, можно делетировать/мутировать в *Shigella flexneri* (например, OspF, IpgD, IpgB1), *Salmonella enterica* (например, SopE, SopB, SptP), *P. aeruginosa* (например, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) или *E. coli* (например, Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ). Нуклеотидные последовательности данных генов доступны специалистам в данной области техники, например в базе данных Genbank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT из NC_002120 GI: 10955536; эффекторные белки *S. flexneri* из AF386526.1 GI: 18462515; эффекторы *S. enterica* из NC_016810.1 GI: 378697983 или FQ312003.1 GI: 301156631; эффекторы *P. aeruginosa* из AE004091.2 GI: 110227054 или CP000438.1 GI: 115583796 и эффекторные белки *E. coli* из NC_011601.1 GI: 215485161).

Для целей настоящего изобретения гены обозначают строчными буквами и курсивом в отличие от белков. Если гены (обозначенные строчными буквами и курсивом) следуют за названием вида бактерий (например, *E. coli*), они обозначают мутацию соответствующего гена в бактерии соответствующего вида. Например, YopE обозначает эффекторный белок, кодируемый геном *yopE*. *YopE Y. enterocolitica* представляет собой

У. *enterocolitica* с мутацией в гене *yopE*.

В настоящем документе термины «полипептид», «пептид», «белок», «полипептидный» и «пептидный» используются взаимозаменяемо и обозначают серию аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями между альфа-амино- и карбоксильными группами соседних остатков. Предпочтительными являются белки, содержащие аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 10 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот.

В соответствии с настоящим изобретением «гетерологичный белок или его фрагмент» включает природные белки или их фрагменты, а также искусственно сконструированные белки или их фрагменты. Искусственно сконструированные белки или их фрагменты представляют собой, например, варианты или функционально активные фрагменты гетерологичного белка. Под «вариантами или их функционально активными фрагментами» в отношении гетерологичного белка в соответствии с настоящим изобретением подразумевают, что указанный фрагмент или вариант (например, аналог, производное или мутант) способен выполнять ту же физиологическую функцию, что и гетерологичный белок. Такие варианты включают природные аллельные варианты и неприродные варианты. В данном определении рассматриваются добавления, делеции, замены и получение производных одной или более аминокислот, если указанные модификации не приводят к потере функциональной активности указанного фрагмента или варианта. Функционально активный фрагмент или вариант предпочтительно характеризуется по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности, наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 98% идентичностью последовательности по отношению к соответствующему фрагменту гетерологичного белка. В настоящем документе термин «гетерологичный белок или его фрагмент» относится к белку или его фрагменту, отличным от эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента, к которому они могут быть присоединены. В частности, в настоящем документе гетерологичный белок или его фрагмент относится к

белку или его фрагменту, не принадлежащим к протеому, т.е. всей совокупности природных белков конкретного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, предложенного и применяемого в соответствии с настоящим изобретением, например не принадлежащим к протеому, т.е. всей совокупности природных белков конкретного штамма бактерий рода *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*.
5 Следует понимать, что в настоящем документе «гетерологичный белок или его фрагмент» означает, что ген или кодирующая последовательность, которая кодирует белок или его фрагмент, не принадлежащий к протеому, т.е. всей совокупности природных белков штамма грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением, внедрен в указанный штамм грамотрицательной бактерии путем генетической трансформации, трансдукции или конъюгации. Гетерологичный белок или его фрагмент может быть расположен на хромосоме или на внехромосомном генетическом элементе указанного штамма грамотрицательной бактерии. Ген или кодирующая последовательность, кодирующие указанный гетерологичный белок или его фрагмент, происходят из источника, отличного от клетки-хозяина, в которую они внедрены. Обычно гетерологичный белок или его фрагмент имеет животное происхождение, включая происхождение из организма человека. Гетерологичный белок или его фрагмент предпочтительно представляют собой белок человека или его фрагмент. Гетерологичный белок или его фрагмент в более предпочтительном случае
10 выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков клеточных сигнальных путей, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, нанотел и гибридных конструкторов на основе нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков или их фрагментов. В особенно предпочтительном случае гетерологичный белок или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла,
20 белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, гибридных конструкторов на основе нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков или их

фрагментов. Еще более предпочтительными являются гетерологичные белки или их фрагменты, выбранные из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновыми повторами или их фрагментов. Наиболее предпочтительными являются белки или их фрагменты, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, или белки или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), в частности белки или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), например гетерологичные белки или их фрагменты животного, предпочтительно человека, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, или белки человека или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН). Белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), или их фрагменты предпочтительно представляют собой белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН) I типа, или их фрагменты, более предпочтительно белки человека или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН) I типа.

В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением содержит две нуклеотидных последовательности, кодирующие идентичные или два различных гетерологичных белка или их фрагмента, присоединенные независимо друг от друга с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением содержит три нуклеотидных последовательности, кодирующие идентичные или три различных гетерологичных белка или их фрагмента, присоединенные независимо друг от друга с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка. В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением содержит четыре нуклеотидных последовательности, кодирующие идентичные или четыре различных гетерологичных

белка или их фрагмента, присоединенные независимо друг от друга с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

5 Гетерологичный белок, экспрессируемый рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии, обычно характеризуется молекулярной массой от 1 до 150 кДа, предпочтительно от 1 до 120 кДа, более предпочтительно от 1 до 100 кДа, наиболее предпочтительно от 10 до 80 кДа. Фрагмент гетерологичного белка обычно содержит от 10 до 1500 аминокислот, предпочтительно от 10 до 800 аминокислот, 10 более предпочтительно от 100 до 800 аминокислот, в частности от 100 до 500 аминокислот. Фрагмент гетерологичного белка в соответствии с определением в настоящем документе обычно обладает теми же функциональными свойствами, что и гетерологичный белок, из которого он получен.

15 В некоторых вариантах реализации фрагмент гетерологичного белка содержит домен гетерологичного белка. Таким образом, в некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен гетерологичного белка. Предпочтительно, штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим 20 изобретением содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую один или два домена гетерологичного белка, более предпочтительно два домена гетерологичного белка.

В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии в соответствии 25 с настоящим изобретением содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, присоединенных с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

30

В настоящем документе термин «гетерологичные белки, относящиеся к одному и тому же функциональному классу белков» относится к гетерологичным белкам,

выполняющим одну и ту же функцию, например, гетерологичным белкам, обладающим специфичной ферментативной активностью, гетерологичным белкам, действующим в одном и том же пути, например, регуляция клеточного цикла, или характеризующимся общим специфичным свойством, например, относящимся к одному и тому же классу бактериальных эффекторных белков. Функциональные классы белков представляют собой, например, белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, белки, действующие в качестве регуляторов клеточного цикла, белки с анкириновыми повторами, белки клеточных сигнальных путей, белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), репортерные белки, факторы транскрипции, протеазы, малые ГТФазы, белки, родственные GPCR, нанотела и гибридные конструкции на основе нанотел, бактериальные эффекторы T3SS, бактериальные эффекторы T4SS или вирусные белки, которые совместно действуют в биологическом процессе установления вирулентности в отношении эукариотических клеток.

5

10

15 В соответствии с настоящим изобретением «домен гетерологичного белка» включает домены природных белков, а также домены искусственно сконструированных белков. В настоящем документе термин «домен гетерологичного белка» относится к домену гетерологичного белка, отличному от домена эффекторного белка T3SS, или домену, отличному от домена, содержащего его N-концевой фрагмент, к которому он может

20

25

30

быть присоединен с получением гибридного белка. В частности, в настоящем документе домен гетерологичного белка относится к домену гетерологичного белка, не принадлежащего к протеому, т.е. всей совокупности природных белков конкретного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, предложенного и применяемого в соответствии с настоящим изобретением, например не принадлежащего к протеому, т.е. всей совокупности природных белков конкретного штамма бактерий рода *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*. Обычно домен гетерологичного белка имеет животное происхождение, включая происхождение из организма человека. Домен гетерологичного белка предпочтительно представляет собой домен белка человека. В более предпочтительном случае домен гетерологичного белка представляет собой домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), регуляторов клеточного цикла, белков с

анкириновыми повторами, белков клеточных сигнальных путей, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, нанотел и гибридных конструкторов на основе нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. В особенно предпочтительном случае домен гетерологичного белка представляет собой домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, гибридных конструкторов на основе нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. Еще более предпочтительными являются домены гетерологичных белков, выбранных из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновыми повторами. Наиболее предпочтительными являются домены белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), например белков животных, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), предпочтительно домены гетерологичных белков человека, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), в частности домены гетерологичных белков человека, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона 1 типа (ИФН).

Домен гетерологичного белка, экспрессируемый рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии, обычно характеризуется молекулярной массой от 1 до 50 кДа, предпочтительно от 1 до 30 кДа, более предпочтительно от 1 до 20 кДа, наиболее предпочтительно от 1 до 15 кДа.

В соответствии с настоящим изобретением «белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН», представляют собой гетерологичные белки, которые, при их присутствии в клетке млекопитающего, например при транслокации рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом в соответствии с настоящим изобретением в клетку млекопитающего, запускают или участвуют в сигнальном событии или сигнальном каскаде, приводящем к экспрессии или измененной

экспрессии, предпочтительно к повышенной экспрессии ИФН клеткой млекопитающего. Белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН, включают STING, TRIF, TBK1, ИКК-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-ПК, RIG1 (DDX58), MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, IFNAR1, IFNAR2, TYK2, JAK1, ISGF3, IL10R2, IFNLR1, IFNGR1, IFNGR2, JAK2, STAT4, ферменты, образующие циклические динуклеотиды (циклазы циклического ди-АМФ, циклазы циклического ди-ГМФ и циклазы циклического ди-ГАМФ), например WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагмент, но не ограничиваются ими.

В соответствии с настоящим изобретением «белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа», представляют собой гетерологичные белки, которые, при их присутствии в клетке млекопитающего, например при транслокации рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом в соответствии с настоящим изобретением в клетку млекопитающего, запускают или участвуют в сигнальном событии или сигнальном каскаде, приводящем к экспрессии или измененной экспрессии, предпочтительно к повышенной экспрессии ИФН I типа клеткой млекопитающего. Белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, включают STING, TRIF, TBK1, ИКК-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-ПК, RIG1, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, ферменты, образующие циклические динуклеотиды (циклазы циклического ди-АМФ, циклазы циклического ди-ГМФ и циклазы циклического ди-ГАМФ), например WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагмент, но не ограничиваются ими.

Предпочтительные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из STING, TRIF, TBK1, ИКК-эпсилон, IRF3, TREX1,

VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG1, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, LSm14A, LRRFIP1, DHX29, DHX15 и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, выбранных из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагмента.

5 Более предпочтительные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из cGAS (например, Uniprot. Q8N884 для белка человека), RIG1 (например, Uniprot. O95786 для белка человека), MDA5 (например, Uniprot. Q9BYX4 для белка человека), IPS-1/MAVS (например, Uniprot. Q7Z434 для белка человека), IRF3 (например, Uniprot. Q14653 для белка человека), IRF7 (например, Uniprot. Q92985 для белка человека), IRF9 (например, Uniprot. Q00978 для белка человека) и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например, циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, выбранных из группы, состоящей из WspR (например, Uniprot. Q9HXT9 для белка *P. aeruginosa*), DncV (например, Uniprot. Q9KVG7 для белка *V. cholerae*), DisA и DisA-подобного белка (например, Uniprot. Q812L9 для белка *B. cereus*), CdaA (например, Uniprot. Q8Y5E4 для белка *L. monocytogenes*), CdaS (например, Uniprot. O31854 или конститутивно активная мутация L44F для белка *B. subtilis*) и cGAS (например, Uniprot. Q8N884 для белка человека) или фрагмента этих белков.

IPS-1/MAVS/Cardif/VISA относится к эукариотическому митохондриальному противовирусному сигнальному белку, содержащему N-концевой домен CARD с идентификатором Uniprot (www.uniprot.org) «Q7Z434» для последовательности человека и «Q8VCF0» для последовательности мыши. Термины «IPS-1/MAVS», «MAVS/IPS-1» и «MAVS» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к эукариотическому митохондриальному противовирусному сигнальному белку, содержащему N-концевой домен CARD с идентификатором Uniprot (www.uniprot.org) «Q7Z434» для последовательности человека и «Q8VCF0» для последовательности мыши.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из белков, содержащих домен CARD, или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, или их фрагментов. Гетерологичные белки, содержащие домен CARD, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, представляет собой, например RIG1, в норме содержащий два домена CARD, MDA5, в норме содержащий два домена CARD, и MAVS, в норме содержащий один домен CARD.

10

Фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, обычно содержит от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно от 100 до 500 аминокислот, еще более предпочтительно от 100 до 362 аминокислот. В некоторых вариантах реализации фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, содержит фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, обычно содержащий от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно от 100 до 500 аминокислот, еще более предпочтительно от 100 до 362 аминокислот, в частности от 100 и 246 аминокислот, или содержащий фрагмент гетерологичного белка, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, с делецией аминокислотной последовательности от 1 до 160 аминокислоты с N-конца, предпочтительно с делецией аминокислотной последовательности, содержащей 1 - 59 или 1 - 160 аминокислот с N-конца, причем указанный фрагмент гетерологичного белка, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, обычно содержит от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно от 100 до 500 аминокислот, еще более предпочтительно от 100 до 362 аминокислот.

20

30 Фрагмент гетерологичных белков, содержащих домен CARD, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, обычно содержит аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 500 с N-конца,

предпочтительно аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 400 с N-конца, более предпочтительно аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 300 с N-конца, более предпочтительно аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 294 с N-конца, более предпочтительно аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 246 с N-конца.

В некоторых вариантах реализации фрагмент гетерологичных белков, содержащих домен CARD, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 294-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 246-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 245-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 231-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 229-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 228-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 218-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 217-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 100-ю аминокислоту с N-конца, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 101-ю аминокислоту с N-конца, конкретнее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 245-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 228-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 217-ю аминокислоту с N-конца, и

аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 100-ю аминокислоту с N-конца, наиболее конкретно аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 245-ю аминокислоту с N-конца гетерологичного белка, предпочтительно гетерологичного белка, содержащего домен CARD человека.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичный белок представляет собой фрагмент гетерологичного белка, содержащего домен CARD, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, или содержит фрагмент гетерологичного белка, содержащего домен CARD, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа. Обычно фрагмент гетерологичного белка, содержащего домен CARD, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, содержит по меньшей мере один домен CARD. В этих вариантах реализации гетерологичный белок, в частности, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 294 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 246 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 231 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 229 аминокислоты с N-конца, аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 228 аминокислоты с N-конца, аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 218 аминокислоты с N-конца, аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 217 аминокислоты с N-конца, аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 100 аминокислоты с N-конца, аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 101 аминокислоты с N-конца, конкретнее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 228 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 217 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 100 аминокислоты с N-конца гетерологичного белка, участвующего в

индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН типа I, содержащего домен CARD.

Конкретнее, в этих вариантах реализации гетерологичный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

5 аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 246 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 229 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 228 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 218 аминокислоты с N-конца, и аминокислотной последовательности от 1

10 аминокислоты до 217 аминокислоты с N-конца, в частности аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 228 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 217 аминокислоты с N-конца, наиболее конкретно аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца RIG-1 или аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 100 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 101 аминокислоты с N-конца MAVS, или аминокислотной

20 последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 294 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до аминокислоты 231 аминокислоты с N-конца MDA5, еще конкретнее аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 228 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 217 аминокислоты с N-конца RIG-1, или аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 100 аминокислоты с N-конца MAVS, или аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 294

25 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 231 аминокислоты с N-конца MDA5.

30

Наиболее предпочтительными являются аминокислотная последовательность от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца RIG-1 человека и аминокислотная последовательность от 1 аминокислоты до 246 аминокислоты с N-конца RIG-1 мыши. Фрагмент 1-245 RIG-1 человека и фрагмент 1-246 RIG-1 мыши соответствуют друг
5 другу с 73% идентичностью последовательностей (и 85% сходством последовательностей) и являются функционально эквивалентными, т.е. оба фрагмента демонстрируют эквивалентную активность в клетках мыши и клетках человека.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичный белок
10 представляет собой фрагмент ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ. Фрагмент ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, обычно содержит аминокислотную
15 последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 600 с N-конца, предпочтительно аминокислотную последовательность от 50 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 550 с N-конца, более предпочтительно аминокислотную последовательность от 60 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 530 с N-конца, в частности аминокислотную последовательность от 60 аминокислоты до 530
20 аминокислоты с N-конца, конкретнее аминокислотную последовательность от 146 до 507 аминокислоты с N-конца или аминокислотную последовательность от 161 аминокислоты до 522 аминокислоты с N-конца, наиболее конкретно аминокислотную последовательность от 161 аминокислоты до 522 аминокислоты с N-конца ферментов, образующих циклические динуклеотиды, предпочтительно сGAS человека. В
25 некоторых вариантах реализации фрагмент сGAS содержит, в частности, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 60 аминокислоту и не более чем 422 аминокислоту, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 146 аминокислоту и не более чем 507 аминокислоту, и аминокислотной
30 последовательности, содержащей по меньшей мере 161 аминокислоту и не более чем 522 аминокислоту. В некоторых вариантах реализации фрагмент сGAS содержит, конкретнее, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

аминокислотной последовательности от 60 аминокислоты до 422 аминокислоты, аминокислотной последовательности от 146 аминокислоты до 507 аминокислоты и аминокислотной последовательности от 161 аминокислоты до 522 аминокислоты, наиболее предпочтительно аминокислотную последовательность от 161 аминокислоты до 522 аминокислоты.

В более предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок или его фрагмент представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбранный из группы, состоящей из RIG1, MDA5 и MAVS, содержащих домен CARD, или их фрагмента, причем указанный фрагмент содержит по меньшей мере один домен CARD, и cGAS и его фрагмента, в частности выбранного из группы, состоящей из RIG1, содержащего домен CARD, и его фрагмента, причем указанный фрагмент содержит по меньшей мере один домен CARD, MAVS, содержащего домен CARD, и его фрагмента, причем указанный фрагмент содержит по меньшей мере один домен CARD, и cGAS и его фрагмента. Фрагменты этих белков, описанные выше, являются особенно предпочтительными. В этом более предпочтительном варианте реализации RIG-1, MDA5, MAVS, содержащие домен CARD, содержат природный(е) домен(ы) CARD и необязательно дополнительно С-концевые аминокислоты, расположенные после природного(ых) домена(ов) CARD, например в случае RIG-1 содержат природный хеликазный домен или его фрагмент, предпочтительно фрагмент, содержащий 1-500, более предпочтительно 1-250, причем указанный природный хеликазный домен или его фрагмент не является функциональным, т.е. не связывает домен CARD, или в случае MAVS необязательно содержат расположенную по ходу транскрипции С-концевую последовательность или ее фрагмент, предпочтительно фрагмент, содержащий 1-500, более предпочтительно 1-250, еще более предпочтительно 1-150 аминокислот. В этих вариантах реализации cGAS и его фрагмент обычно содержат природный синтазный домен (центральный NТазный и С-концевой домен; аминокислоты 160-522 cGAS человека, как описано в (Kranzusch et al., 2013) и, например, Uniprot. Q8N884 для белка человека), cGAS и его фрагмент предпочтительно содержат природный синтазный домен, но несут полную или частичную делецию N-концевого домена, предпочтительно делецию всего N-концевого спирального протяженного сегмента (N-концевой спиральный протяженный сегмент;

аминокислоты 1-160 cGAS человека, как описано в (Kranzusch et al., 2013) и, например, Uniprot. Q8N884 для белка человека). Полная или частичная делеция N-концевого домена предпочтительно представляет собой делецию 1 – 160 аминокислот.

5 В предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок или его фрагмент представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбранный из группы, состоящей из белков семейства RIG-I-подобного рецептора (RLR) (например, RIG1 и MDA5) или их фрагментов, других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусных сигнальных путях и индукции ИФН I

10 типа (например, MAVS), или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, выбранных из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагментов. Ферменты, образующие циклические динуклеотиды, например циклазы циклического ди-АМФ,

15 циклазы циклического ди-ГМФ и циклазы циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагментов, приводят к стимуляции STING.

В некоторых вариантах реализации гетерологичный белок или его фрагмент

20 представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбранный из группы, состоящей из RIG1, MDA5, LGP2, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, или его фрагмент, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из RIG1, MAVS, MDA5, WspR, DncV, DisA-подобного белка и cGAS, или его фрагмент, наиболее предпочтительно выбранный из

25 группы, состоящей из RIG1 или его фрагмента и cGAS или его фрагмента.

В более предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагмента, еще более

30 предпочтительно выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагмента, в частности выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS и cGAS или их фрагмента. Фрагменты этих белков,

описанные выше, являются особенно предпочтительными. В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG1, MDA5, MAVS обычно содержит аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 500 с N-конца, предпочтительно аминокислотную последовательность от 1 до любой из аминокислот 100 - 400 с N-конца, более предпочтительно аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 300 с N-конца.

В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 246-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 245-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 229-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 228-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 218-ю аминокислоту с N-конца, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 217-ю аминокислоту с N-конца, в частности аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 245-ю аминокислоту с N-конца; фрагмент MDA5 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 294-ю аминокислоту с N-конца, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 231-ю аминокислоту с N-конца, а фрагмент MAVS содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 100-ю аминокислоту с N-конца, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 1-ю аминокислоту и не более чем 101-ю аминокислоту с N-конца.

Конкретнее, в этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 246 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 229 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 228 аминокислоты с N-конца, аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 218 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 217 аминокислоты с N-конца, еще конкретнее аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца, аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 228 аминокислоты с N-конца, аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 217 аминокислоты с N-конца, наиболее конкретно аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до 245 аминокислоты с N-конца; фрагмент MDA5 содержит, конкретнее, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 294 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 231 аминокислоты с N-конца; и фрагмент MAVS содержит, конкретнее, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 100 аминокислоты с N-конца и аминокислотной последовательности от 1 аминокислоты до 101 аминокислоты с N-конца.

В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS обычно содержит аминокислотную последовательность от 1 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 600 с N-конца, предпочтительно аминокислотную последовательность от 50 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 550, более предпочтительно аминокислотную последовательность от 60 аминокислоты до любой из аминокислот 100 - 530, в частности аминокислотную последовательность от 60 аминокислоты до 530 аминокислоты, аминокислотную последовательность от 146 аминокислоты до 507 аминокислоты или аминокислотную последовательность от 161 аминокислоты до 530 аминокислоты, конкретнее аминокислотную последовательность от 60 аминокислоты до 530 аминокислоты или аминокислотную последовательность от 161 аминокислоты до 530 аминокислоты cGAS человека.

В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS содержит, в частности, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 60-ю аминокислоту и не более чем 422-ю аминокислоту, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 146-ю аминокислоту и не более чем 507-ю аминокислоту, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере 161-ю аминокислоту и не более чем 522-ю аминокислоту. Конкретнее, в этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от 60 аминокислоты до 422 аминокислоты, аминокислотной последовательности от 146 аминокислоты до 507 аминокислоты, аминокислотной последовательности от 161 аминокислоты до 522 аминокислоты, наиболее конкретно аминокислотную последовательность от 161 аминокислоты до 522 аминокислоты.

В еще более предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из доменов₁₋₂₄₅ CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 1), доменов₁₋₂₂₈ CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 2), доменов₁₋₂₁₇ CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 3), доменов₁₋₂₄₆ CARD RIG1 мыши (SEQ ID NO: 4), доменов₁₋₂₂₉ CARD RIG1 мыши (SEQ ID NO: 5), доменов₁₋₂₁₈ CARD RIG1 мыши (SEQ ID NO: 6), доменов₁₋₁₀₀ CARD MAVS человека (SEQ ID NO: 7), домена₁₋₁₀₁ CARD MAVS мыши (SEQ ID NO: 8), cGAS *N. vectensis* (SEQ ID NO: 9), cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека (SEQ ID NO: 10), cGAS₁₄₆₋₅₀₇ мыши (SEQ ID NO: 11), cGAS₆₀₋₄₂₂ *N. vectensis* (SEQ ID NO: 12), MDA5₁₋₂₉₄ мыши (SEQ ID NO: 13), MDA5₁₋₂₃₁ мыши (SEQ ID NO: 14), MDA5₁₋₂₉₄ человека (SEQ ID NO: 15) и MDA5₁₋₂₃₁ человека (SEQ ID NO: 16).

В особенно предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из доменов₁₋₂₄₅, CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 1), доменов₁₋₂₂₈ CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 2), доменов₁₋₂₁₇ CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 3), домена₁₋₁₀₀ CARD MAVS человека (SEQ ID NO: 7) и cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека (SEQ ID NO: 10).

В конкретнеем предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из доменов₁₋₂₄₅ CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 1), доменов₁₋₂₄₆ CARD RIG1 мыши (SEQ ID NO: 4), доменов₁₋₂₂₉ CARD RIG1 мыши (SEQ ID NO: 5), доменов₁₋₂₁₈ CARD RIG1 мыши (SEQ ID NO: 6) и cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека (SEQ ID NO: 10), наиболее конкретно выбран из группы, состоящей из доменов₁₋₂₄₅ CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 1) и cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека (SEQ ID NO: 10).

10 Семейство RIG-I-подобных рецепторов (RLR) содержит белки, выбранные из группы, состоящей из RIG1, MDA5 и LGP2. Предпочтительные гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, представляют собой белки RIG1 и MDA5, содержащие домен CARD, в частности белок RIG1, содержащий домен CARD. Другие предпочтительные белки, содержащие домен CARD и участвующие в
15 индукции ИФН I типа, включают белки, выбранные из группы, состоящей из MAVS.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы белков, содержащей домен CARD RIG1, домен CARD MDA5 и/или домен CARD
20 MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, и их фрагментов, предпочтительно выбраны из группы белков, содержащей домен CARD RIG1, домен CARD MDA5 и/или домен CARD MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA и cGAS, или их фрагментов.

25 В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из домена CARD RIG1, домена CARD MDA5, домена CARD MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, более предпочтительно
30 выбраны из группы, состоящей из домена CARD RIG1, WspR, DncV, DisA-подобного белка и cGAS.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки,

- участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, содержат один или более (например, два, три или четыре) доменов CARD, предпочтительно содержат один или более (например, два, три или четыре) доменов CARD RIG1, MDA5 и/или MAVS, предпочтительно RIG1 и/или MAVS. В более предпочтительном варианте реализации
- 5 гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, содержат оба домена CARD RIG1, оба домена CARD MDA5 и/или домен CARD MAVS и cGAS или их фрагмент, в частности оба домена CARD RIG1 и cGAS, или их фрагмент, конкретнее оба домена CARD RIG1.
- 10 В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из белка, индуцирующего ответ ИФН I типа, не обладающего ферментативной функцией и белка, индуцирующего ответ ИФН I типа, обладающего ферментативной функцией. Белок, индуцирующий ответ ИФН I типа и не обладающий ферментативной функцией,
- 15 включенный в рамки настоящего изобретения, обычно содержит по меньшей мере один домен CARD, предпочтительно два домена CARD. Домен CARD обычно состоит из пучка из шести - семи альфа-спиралей, предпочтительно конфигурации из шести - семи антипараллельных альфа-спиралей с гидрофобным сердечником и внешней поверхностью, состоящей из заряженных остатков. Белок, индуцирующий ответ ИФН I
- 20 типа и обладающий ферментативной функцией, включенный в рамки настоящего изобретения, обычно включает фермент, образующий циклический динуклеотид (циклазы циклического ди-АМФ, циклазы циклического ди-ГМФ и циклазы циклического ди-ГАМФ), или его домен, приводящий к стимуляции STING, предпочтительно диаденилатциклазу (DAC), дигуанилатциклазу (DGC) или ГМФ-
- 25 АМФ-циклазу (GAC) или их домен.

В соответствии с настоящим изобретением «белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза», включают Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Araf1, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 10, DFFA, DFFB, ROCK1, APP,

30 CAD, ICAD, CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM, ATR, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), семейство IAP, LC8, PP2B, белки 14-3-3, PKA, PKC, PI3K, Erk1/2, p90RSK, TRAF2, TRADD, FADD, Daxx, каспазу 8, каспазу 2, RIP, RAIDD, MKK7, JNK, белки

FLIP, FKHR, GSK3, белки CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) и семейство Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2), но не ограничиваются ими. Предпочтительно используют Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, каспаза 9, каспаза 3, каспаза 6, каспаза 7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Дахх, каспаза 8, каспаза 2, RIP, RAIDD, FKHR, белки CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), наиболее предпочтительно - BIM, Bid, укороченный Bid, FADD, каспаза 3 (и ее субъединицы), Bax, Bad, Akt, белки CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) (Brenner and Mak, 2009; Chalah and Khosravi-Far, 2008; Fuchs and Steller, 2011). Белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, дополнительно включают DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid и tBid, Egl-1, Bcl-Gs, цитохром С, беклин, CED-13, BNIP1, BNIP3, Bcl-B, Bcl-W, Ced-9, A1, NR13, Bfl-1, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 8.

Белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из проапоптотических белков, антиапоптотических белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз, и ингибиторов сигнальных каскадов или путей, способствующих выживанию. Проапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD, семейства каспаз и белков CDK и их ингибиторов, например семейства INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), или выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD и семейства каспаз. Предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз, белки CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). В равной степени предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз.

Антиапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13, семейства IAP и Bfl-1. Предпочтительными являются Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13 и Bfl-1.

- 5 Ингибиторы путей, предотвращающих апоптоз, включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, Noxa и Cdc25A. Предпочтительными являются Bad и Noxa. Ингибиторы сигнальных каскадов или путей, способствующих выживанию, включают белки, выбранные из группы, состоящей из PTEN, ROCK, PP2A, PHLPP, JNK, p38. Предпочтительными являются PTEN, ROCK, PP2A и PHLPP.

10

В некоторых вариантах реализации гетерологичный белок, участвующий в апоптозе или регуляции апоптоза, выбран из группы, состоящей белков, содержащих только домен BH3, каспаз и белков внутриклеточных сигнальных путей контроля апоптоза за счет рецепторов гибели клеток или их фрагментов. Белки, содержащие только домен

- 15 BH3, являются предпочтительными. Белки, содержащие только домен BH3, включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, BIM, Bid and tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, NrK/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13. Предпочтительными являются Bad, BIM, Bid и tBid, в частности tBid.

- 20 Каспазы включают белки, выбранные из группы, состоящей из каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10. Предпочтительными являются каспаза 3, каспаза 8 и каспаза 9.

- Белки внутриклеточных сигнальных путей контроля апоптоза за счет рецепторов гибели клеток включают белки, выбранные из группы, состоящей из FADD, TRADD, 25 ASC, VAP31, GULP1/CED-6, CIDEA, MFG-E8, CIDEA, RIPK1/RIP1, CRADD, RIPK3/RIP3, Crk, SHB, CrkL, DAXX, семейства 14-3-3, FLIP, DFF40 и 45, PEA-15, SODD. Предпочтительными являются FADD и TRADD.

- 30 В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии содержит два гетерологичных белка, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, причем один белок представляет собой проапоптотический белок, а второй белок представляет собой ингибитор путей, предотвращающих апоптоз, или один белок представляет

собой проапоптотический белок, а второй белок представляет собой ингибитор сигнальных каскадов или путей, способствующих выживанию.

5 Проапоптотические белки, включенные в рамки настоящего изобретения, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и обычно содержат по меньшей мере один из доменов ВН1, ВН2, ВН3 или ВН4, предпочтительно содержат по меньшей мере один домен ВН3. Обычно проапоптотические белки, включенные в рамки настоящего изобретения, не обладают ферментативной активностью.

10 Антиапоптотические белки, включенные в рамки настоящего изобретения, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и содержат комбинацию различных доменов ВН1, ВН2, ВН3 и ВН4, предпочтительно комбинацию различных доменов ВН1, ВН2, ВН3 и ВН4, в которой присутствуют домены ВН1 и ВН2, более предпочтительно ВН4-ВН3-ВН1-ВН2, ВН1-ВН2, ВН4-ВН1-ВН2 или ВН3-ВН1-ВН2 (от 15 N-конца к C-концу). Дополнительно в рамки настоящего изобретения также включены белки, содержащие по меньшей мере один домен В1R.

Ингибиторы путей, предотвращающих апоптоз, включенные в рамки настоящего изобретения, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и обычно содержат 20 один домен ВН3.

Длина каждого из доменов ВН1, ВН2, ВН3 или ВН4 обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот. Таким образом, в некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из гетерологичных белков, участвующих в 25 апоптозе или регуляции апоптоза, длина которых составляет от приблизительно 5 до приблизительно 200, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 150, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 100, наиболее предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 50, в частности от приблизительно 5 до приблизительно 25 аминокислот.

30 Особенно предпочтительный гетерологичный белок представляет собой домен ВН3 индуктора апоптоза tBID, конкретнее домен ВН3, содержащий последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-20, предпочтительно SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.

В равной степени предпочтительным является домен ВНЗ регулятора апоптоза ВАХ, конкретнее домен ВАХ, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-24, предпочтительно SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22. В SEQ ID NO приведены последовательности человека и мыши, однако в настоящее изобретение в равной степени включены домены ВНЗ tBID и ВАХ всех других видов.

Еще один особенно предпочтительный гетерологичный белок представляет собой гетерологичный белок, содержащий домен белка, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, конкретнее гетерологичный белок, содержащий домен белка, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбранный из группы, состоящей из i) домена CARD RIG1, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6, ii) домена CARD MDA5, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-16, предпочтительно SEQ ID NO: 15 или 16, и iii) домена CARD MAVS, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 или 8, предпочтительно SEQ ID NO: 7. Еще один особенно предпочтительный гетерологичный белок представляет собой полноразмерный cGAS, например cGAS N. vectensis (SEQ ID NO: 9), cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека (SEQ ID NO: 10), cGAS₆₀₋₄₂₂ N. vectensis (SEQ ID NO: 12) или cGAS₁₄₆₋₅₀₇ мыши (SEQ ID NO: 11). Наиболее предпочтительными гетерологичными белками являются гетерологичные белки, содержащие домен CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 1-3), в частности домен CARD RIG1 человека (SEQ ID NO: 1) и cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека (SEQ ID NO: 10).

25

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки представляют собой фермент, выполняющий конверсию пролекарства. В этих вариантах реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии экспрессирует, предпочтительно экспрессирует и секретирует фермент, выполняющий конверсию пролекарства. В настоящем документе фермент, выполняющий конверсию пролекарства, включает ферменты, выполняющие конверсию нетоксичных пролекарств в токсичное лекарственное вещество, предпочтительно ферменты, выбранные из группы, состоящей

30

из цитозиндезаминазы, фосфорилазы пуриновых нуклеозидов, тимидинкиназы, бета-галактозидазы, карбоксилэстераз, нитроредуктаз, карбоксипептидаз и бета-глюкуронидаз, более предпочтительно ферменты, выбранные из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, фосфорилазы пуриновых нуклеозидов, тимидинкиназы и бета-галактозидазы.

Термин «сайт расщепления протеазой» в настоящем документе относится к специфичному аминокислотному мотиву в аминокислотной последовательности, например в аминокислотной последовательности белка или гибридного белка, который расщепляется специфичной протеазой, распознающей указанный аминокислотный мотив. Обзор см. в источнике (Waugh, 2011). Примеры сайтов расщепления протеазой представляют собой аминокислотные мотивы, расщепляемые протеазой, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека (HRV 3C), протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Ха и тромбина.

Соответствующие протеазы распознают следующие аминокислотные мотивы:

- Asp-Asp-Asp-Lys: энтерокиназа (легкая цепь) / энтеропептидаза (SEQ ID NO: 37)
- Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro: протеаза PreScission/протеаза риновируса человека (HRV 3C) (SEQ ID NO:38)
- Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser и модифицированные мотивы на основе Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (где X представляет собой любую аминокислоту) распознаются протеазой TEV (вируса гравировки табака) (SEQ ID NO: 39) и (SEQ ID NO: 40)
- Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Ser: протеаза TVMV (SEQ ID NO: 41)
- Ile-(Glu или Asp)-Gly-Arg: протеаза фактор Ха (SEQ ID NO: 42)
- Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: тромбин (SEQ ID NO: 43).

Сайты расщепления протеазой в настоящем документе включают убиквитин. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах реализации убиквитин используют в качестве сайта расщепления протеазой, т.е. нуклеотидная последовательность кодирует убиквитин в качестве сайта расщепления протеазой, который могут расщеплять по N-концевому сайту специфичные убиквитин-процессирующие протеазы, например который в клетке, в которую доставлен данный гибридный белок, могут

эндогенно расщеплять по N-концевому сайту специфичные убиквитин-процессирующие протеазы, называемые деубиквитинирующими ферментами. Процессинг убиквитина по C-концу осуществляет группа эндогенных убиквитин-специфичных C-концевых протеаз (деубиквитинирующих ферментов, DUB).

- 5 Расщепление убиквитина DUB, как полагают, происходит на самом C-конце убиквитина (после G76).

Термин «мутация» в настоящем документе используется в качестве общего термина и включает изменения как одной пары оснований, так и множества пар оснований. Такие
10 мутации могут включать замены, мутации со сдвигом рамки считывания, делеции, вставки и укорочения.

В настоящем документе термин «сигнал внутриядерной локализации» относится к аминокислотной последовательности, которая помечает белок для импорта в ядро
15 эукариотической клетки и, предпочтительно, включает вирусный сигнал внутриядерной локализации, например NLS, полученный из большого Т-антигена SV40 (PPKKKRKV) (SEQ ID NO: 44).

В настоящем документе термин «сайт множественного клонирования» относится к
20 короткой последовательности ДНК, содержащей несколько сайтов рестрикции для расщепления эндонуклеазами рестрикции, например AclI, HindIII, SspI, MluCI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, BmrI, BglII, AfeI, AluI, StuI, ScaI, ClaI, BspDI, PI-SceI, NsiI, AseI, SwaI, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraIII, AleI, EcoP15I, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, TspRI, NdeI,
25 NlaIII, CviAII, FatI, MslI, FspEI, XcmI, BstXI, PflMI, BccI, NcoI, BseYI, FauI, SmaI, XmaI, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, AciI, SacII, BsrBI, MspI, HpaII, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsaJI, BslI, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrII, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspA1I, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, EarI, AcuI, PstI, BpmI, DdeI, SfcI, AflII, BpuEI, SmlI,
30 AvaI, BsoBI, MboII, BbsI, XmnI, BsmI, Nb.BsmI, EcoRI, HgaI, AatII, ZraI, Tth111I PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, PleI, Nt.BstNBI, MlyI, HinfI, EcoRV, MboI, Sau3AI, DpnII BfuCI, DpnI, BsaBI, TfiI, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI,

SfaNI, SphI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HinPII, HhaI, BssHIII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, NheI, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, BlpI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, FokI, BtsCI, HaeIII, PhoI, FseI, SfiI, NarI, KasI, SfoI, PluTI, AscI, EciI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau96I, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, AvaII, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, RsaI, CviQI, BstZ17I, BciVI, SalI, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, AccI, Hpy166II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAI, ApoI, NspI, BsrFI, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqαI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, PI-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PsiI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, EaeI, предпочтительно XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. В настоящем документе термин «сайт множественного клонирования» также относится к короткой последовательности ДНК, используемой для событий рекомбинации, например в стратегии клонирования Gateway, или для таких способов, как сборка Гиббсона или клонирование в ТОРО-системе.

15

В настоящем документе термин «штамм дикого типа» или «штамм грамотрицательной бактерии дикого типа» относится к природному варианту или природному варианту, несущему генетические модификации, позволяющие применять векторы, например делеционные мутации в генах эндонуклеаз рестрикции или генах устойчивости к антибиотикам. Эти штаммы содержат хромосомную ДНК, а также, в некоторых случаях (например, *Y. enterocolitica*, *S. flexneri*), немодифицированную плазмиду вирулентности.

20

В настоящем документе термин «штамм *Yersinia* дикого типа» относится к природному варианту (например, *Y. enterocolitica* E40) или природному варианту, содержащему генетические модификации, позволяющие применять векторы, например делеционные мутации в генах эндонуклеаз рестрикции или генах устойчивости к антибиотикам (например, *Y. enterocolitica* MRS40 - штамм, происходящий от *Y. enterocolitica* E40, чувствительный к ампициллину). Эти штаммы содержат хромосомную ДНК, а также немодифицированную плазмиду вирулентности (под названием pYV).

25

Y. enterocolitica subspecies *palaearctica* относится к низкопатогенным штаммам *Y. enterocolitica*, которые отличаются от более вирулентных штаммов подвида *enterocolitica* (Howard et al., 2006; Thomson et al., 2006). У *Y. enterocolitica* subsp.

30

paleoarctica отсутствует, по сравнению с *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica*, остров высокой патогенности (НПИ). Этот НПИ кодирует сидерофор железа, называемый иерсиниабактином (Pelludat et al., 2002). Отсутствие иерсиниабактина у *Y. enterocolitica* subsp. *paleoarctica* делает данный подвид менее патогенным и зависимым от индуцируемого системно доступного железа для развития устойчивой инфекции, например в печени или селезенке (Pelludat et al., 2002). Железо может стать доступным для бактерии в организме индивида, например в результате предварительного введения дефероксамина - хелатора железа, который применяют для лечения перенасыщения железом у пациентов (Mulder et al., 1989).

10

В настоящем документе термин «иммунная контрольная точка» или «молекула иммунной контрольной точки» относится к отрицательному или положительному стимулу, ослабляющему или стимулирующему иммунный ответ, вызываемый активацией Т-клеточного рецептора родственным HLA/антигеном или другой активацией иммунной системы. Молекулы иммунных контрольных точек обычно участвуют в иммунных путях и, например, регулируют активацию Т-клеток, пролиферацию Т-клеток и/или функцию Т-клеток. Многие из молекул иммунных контрольных точек принадлежат к надсемейству иммуноглобулинов, конкретнее к семейству B7-CD28, или к надсемейству фактора некроза опухоли/рецепторов фактора некроза опухоли (TNF/TNFR) и, за счет связывания специфических лигандов, активируют сигнальные молекулы, которые рекрутируются в цитоплазматический домен (Suzuki et al., 2016).

15

Примеры иммунных контрольных точек включают, без ограничения, иммунные контрольные точки пути PD-1, например PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273); иммунные контрольные точки пути CTLA-4, например, CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2); иммунные контрольные точки пути OX40, например, OX40 (CD134), OX40L (CD252); иммунные контрольные точки пути 41BB, например, CD137 (41BB), CD137L (41BB-L); иммунные контрольные точки пути ICOS, например, ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1); иммунные контрольные точки пути LAG-3, например, LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II; иммунные контрольные точки пути TIM-3, например, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9 (галектин 9), TIM3-L; иммунные контрольные точки пути CD28, например B7.1 (Cd80), B7.2 (CD86) и CD28;

25

30

иммунные контрольные точки путей рецепторов семейства KIR, например KIR, белков KIRDS (KIR2DS и KIR3DS), белков KIRDL (KIR2DL и KIR3DL), MHC-I; B7-H3 (CD276); B7-H4 (VTCN1); A2aR; иммунные контрольные точки пути CD27, например CD27, CD70 (CD27L); иммунные контрольные точки пути BTLA, например, BTLA
 5 (CD272), HVEM (Cogdill et al., 2017; Pardoll, 2012); иммунные контрольные точки пути TIGIT, например, TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRL2), PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111), DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96); иммунные контрольные точки пути GITR, например GITR (CD357), GITRL; иммунные контрольные точки пути CD40, например CD40, CD40L (CD154); TIM-1; VISTA (B7-H5
 10 или PD-1H); CEACAM1 (Cogdill et al., 2017; Gray-Owen and Blumberg, 2006; Holder and Grant, 2020; Waldman et al., 2020); иммунные контрольные точки пути ICAM, например ICAM, LFA-1, CD2; иммунные контрольные точки пути CD160, например CD160, HVEM; иммунные контрольные точки пути LFA, например LFA-1, LFA-3; иммунные контрольные точки пути CD226, например CD226, Cd112 (Cogdill et al., 2017);
 15 иммунные контрольные точки пути LILRB, например PIR-B (gp49B), LILRB1-LILRB5 (CD85J, CD85D, CD85A, CD85K и CD85C или LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8; LILRB 1–4, также = ILT2, ILT4, ILT5, ILT3) (Kang et al., 2016); иммунные контрольные точки пути SIRP, например SIRP-альфа, CD47 (Seiffert et al., 2001); иммунные контрольные точки пути GARP, например GARP, TGF-бета 1 (de Streele et al., 2020); иммунные
 20 контрольные точки пути TNFR, например TNFR, TNF α ; DcR3 (FasR); DR3; TL1A (Bodmer et al., 2002; Meylan et al., 2011); IDO (Liu et al., 2010); TDO (Platten et al., 2014), иммунные контрольные точки пути B7-H6, например B7-H6, Nkp30 (Obiedat et al., 2020); иммунные контрольные точки пути CD94, например CD94, NKG2A, HLA-E (Sheu et al., 2005); иммунные контрольные точки пути CSF1R, например CSF1, CSF1R
 25 (Zhu et al., 2014); TIM-4 (Cheng and Ruan, 2015); иммунные контрольные точки пути SLAM, например 2B4 (CD244), белки SLAM, например CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2) (Agresta et al., 2018; McArdel et al., 2016); CD122 (Mathews et al., 2018); ФС (фосфатидилсерин) (Dayoub and Brekken, 2020); иммунные контрольные точки пути CD30, например CD30, CD30L/TNFSF8 (Oflazoglu et al., 2009); LIGHT/CD258 (Skeate et
 30 al., 2020); CD69 (Mita et al., 2018); галектин 1 (Ito et al., 2012); LAIR-1 (CD305) (Sledzinska et al., 2015). Термины в скобках относятся к синонимам соответствующих белков, которые указаны для удобства. В качестве примера, CD154 является синонимом

CD40L, который, таким образом, указан как CD40L (CD154). Перечень синонимов не является исчерпывающим, и для многих иммунных контрольных точек существуют дополнительные синонимы.

- 5 В настоящем документе термин «модулятор иммунной контрольной точки (ICM)» относится к молекуле, то есть к белку в виде антитела, модулирующему иммунную контрольную точку. Модулятор иммунной контрольной точки (ICM) влияет на иммунные контрольные точки и модулирует функцию одной или более молекул иммунных контрольных точек. В настоящем документе «модуляция» или
- 10 «модулировать» в отношении ICM означает, что ICM полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует, активирует, стимулирует, увеличивает, усиливает или поддерживает функцию одной или более молекул иммунной контрольной точки. Таким образом, модулятор иммунной контрольной точки может представлять собой «ингибитор иммунной контрольной точки» (также называемый «ингибитором
- 15 контрольной точки» или «ингибитором») или «активатор иммунной контрольной точки» (также называемый «активатором контрольной точки» или «активатором»).

Примерами модуляторов иммунных контрольных точек, которые позволяют вносить помехи в функцию иммунных контрольных точек, например PD-1, PD-L1 или CTLA4,

20 являются ингибиторы иммунных контрольных точек (CPI), например антитело против PD-1, антитело против PD-L1 или антитело против CTLA4, которые предотвращают или уменьшают отрицательную обратную связь соответствующей петли отрицательной обратной связи. Впечатляющее доказательство принципа этого подхода появилось в

25 4 моноклональным антителом ипилимумаб у пациентов с метастатической меланомой, которое продемонстрировало повышенную выживаемость у пациентов, получавших лечение (Hodi, 2010).

Модуляторы иммунных контрольных точек, как правило, способны модулировать (i)

30 аутоотолерантность и/или (ii) амплитуду и/или продолжительность иммунного ответа. Модулятор иммунной контрольной точки, используемый в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно модулирует функцию одной или более молекул

контрольной точки человека и, таким образом, является «модулятором контрольной точки человека».

Соответственно, функция иммунных контрольных точек, подвергаемых модуляции (например, полному или частичному снижению, ингибированию, мешающему влиянию, активации, стимуляции, повышению, усилению или поддержанию) за счет модуляторов контрольных точек, обычно представляет собой регуляцию активации Т-клеток, пролиферации Т-клеток и/или функции Т-клеток.

Модулятор иммунной контрольной точки предпочтительно представляет собой активатор или ингибитор одной или более молекул иммунных контрольных точек, выбранных из группы, состоящей из иммунных контрольных точек пути PD-1, например PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273); иммунных контрольных точек пути CTLA-4, например CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2); иммунных контрольных точек пути LAG-3, например LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II; иммунных контрольных точек пути TIM-3, например TIM-3 (HAVcr-2); Gal9 (галектина 9); TIM3-L; B7-H3 (CD276); B7-H4 (VTCN1); иммунных контрольных точек пути TIGIT, например TIGIT, PVR (CD155), нектина-2 (CD112 или PVRL2), PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111), DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96); VISTA (B7-H5);IDO; иммунных контрольных точек пути OX40, например OX40 (CD134), OX40L (CD252); иммунных контрольных точек пути 41BB, например CD137 (41BB), Cd137L (41BB-L); иммунных контрольных точек пути ICOS, например ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1); иммунных контрольных точек путей рецепторов семейства KIR, например KIR, белков KIRDS (KIR2DS и KIR3DS), белков KIRDL (KIR2DL и KIR3DL), MHC-I; A2aR; иммунных контрольных точек пути CD27, например CD27, CD70 (CD27L); иммунных контрольных точек пути BTLA, например, BTLA, HVEM; иммунных контрольных точек пути GITR, например GITR, GITRL; иммунных контрольных точек пути CD40, например CD40, CD40L (CD154); TIM-1; CEACAM1; иммунных контрольных точек пути ICAM, например ICAM, LFA-1, CD2; иммунных контрольных точек пути CD160, например CD160, HVEM; иммунных контрольных точек пути CD226, например CD226, Cd112; иммунных контрольных точек пути LILRB, например PIR-B (gp49B), LILRB1-LILRB5 (CD85J, CD85D, CD85A, CD85K и CD85C или LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8; LILRB 1-4, также = ILT2, ILT4, ILT5, ILT3); иммунных контрольных точек пути SIRP, например SIRP-альфа, CD47;

иммунные контрольные точки пути GARP, например GARP, TGF-β1; TDO; иммунных контрольных точек пути CD94, например CD94, NKG2A, HLA-E; иммунных контрольных точек пути CSF1R, например CSF1, CSF1R; иммунных контрольных точек пути SLAM, например 2B4 (CD244), SLAM как CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2).

5 Более предпочтительно, модулятор иммунной контрольной точки представляет собой активатор или ингибитор одной или более молекул иммунных контрольных точек, выбранных из группы, состоящей из иммунных контрольных точек пути PD-1, например PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273); иммунных контрольных точек пути CTLA-4, например, CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2); иммунных контрольных точек пути LAG-3, например, LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II; иммунных контрольных точек пути TIM-3, например, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9, TIM3-L; B7-H3 (CD276); B7-H4 (VTCN1); иммунных контрольных точек пути TIGIT, например, TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRIG); VISTA (B7-H5); и IDO.

10 Наиболее предпочтительно, модулятор иммунной контрольной точки представляет собой активатор или ингибитор одной или более молекул иммунных контрольных точек, выбранных из группы, состоящей из иммунных контрольных точек пути PD-1, например, PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273); и иммунных контрольных точек пути CTLA-4, например, CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2).

20 «Ингибитор иммунной контрольной точки» (также называемый в настоящем документе «ингибитором контрольной точки» или «ингибитором») полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно влияет на функцию одной или более молекул контрольных точек.

30 «Активатор иммунной контрольной точки» (также называемый в настоящем документе «активатором контрольной точки» или «активатором») полностью или частично активирует, стимулирует, увеличивает, усиливает, поддерживает или положительно влияет на функцию одной или более молекул контрольных точек.

Термины «антагонист PD-1» или «ингибитор PD-1» используются в настоящем

документе взаимозаменяемо и относятся к молекуле, например антителу, которое полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует функцию PD1, PDL1 и/или PDL2.

- 5 Термины «антагонист CTLA-4» или «ингибитор CTLA-4» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к молекуле, например антителу, которое полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует функцию CTLA-4.
- 10 Термины «белок запрограммированной гибели-1», «белок запрограммированной гибели клеток-1» или «PD-1» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к иммуоингибирующему рецептору, принадлежащему к семейству CD28. PD-1 экспрессируется преимущественно на ранее активированных Т-клетках *in vivo* и связывается с двумя лигандами - PD-L1 и PD-L2. Термин «PD-1» в настоящем
- 15 документе включает PD-1 человека (hPD-1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-1 и его аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-1. Аналогичным образом, термин «PD-L1» в настоящем документе включает PD-L1 человека (hPD-L1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L1 и его аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L1, а термин «PD-L2» в
- 20 настоящем документе включает PD-L2 человека (hPD-L2), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L2 и его аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L2. Полную последовательность hPD-1 можно найти под учетным номером GenBank U64863 или Uniprot No. Q15116. Полную последовательность белка PD-L1 человека можно найти под учетным номером Uniprot No. Q9NZQ7, а полную
- 25 последовательность PD-L2 человека можно найти под учетным номером Uniprot No. Q9BQ51.

- Термины «антиген-4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами», «CTLA-4», «CTLA4», «антиген CTLA-4» и «CD152» (см., например, (Murata and Dalakas, 1999))
- 30 используются взаимозаменяемо и включают варианты, изоформы, видовые гомологи CTLA-4 человека и его аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с CTLA-4 (см., например, (Balzano et al., 1992)). Полную нуклеотидную

последовательность CTLA-4 можно найти под учетным номером GenBank L15006 или UniProt No. P16410.

5 Термин «антитело человека» (HuMAb) или «полностью человеческое антитело» в настоящем документе относится к антителу, содержащему переменные области, в которых как каркасные области, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, эта константная область также получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека в соответствии с
10 настоящим изобретением могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*). Однако термин «антитело человека» в данном контексте не подразумевает включения антител, в которых последовательности CDR,
15 полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например мыши, пересажены на каркасные последовательности человека. Термины антитела «человека» и «полностью человеческие» антитела используются как синонимы.

В настоящем документе термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в
20 котором некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR антитела животного, не являющегося человеком, заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В одном варианте реализации гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR заменены аминокислотами
25 иммуноглобулинов человека, в то время как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или более областей CDR не изменены. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот допустимы, если они не подавляют способность антитела связываться с конкретным антигеном. «Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, аналогичную
30 специфичности исходного антитела.

В настоящем документе термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором переменные области происходят от одного вида, а константные области происходят от другого вида животных, например, антителу, в котором переменные области являются происходят от антитела мыши, а константные области происходят от антитела человека.

В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемые разбавители, вспомогательные вещества или носители" относится к разбавителям, вспомогательным веществам или носителям, подходящим для применения у людей и/или животных без неоправданных нежелательных побочных эффектов (например, токсичности, раздражения и аллергической реакции), соразмерных с разумным соотношением польза/риск. «Разбавители» представляют собой агенты, добавляемые к общему объему действующего вещества, составляющего твердую композицию. В результате размер твердой композиции увеличивается, что облегчает работу с ним. Разбавители удобны при низких дозах лекарственного средства в твердой композиции, когда размер указанной твердой композиции без их применения был бы слишком мал. "Вспомогательные вещества" могут представлять собой связующие вещества, смазочные материалы, скользящие вещества, добавки для получения покрытия или их комбинации. Таким образом, вспомогательные вещества предназначены для использования в различных целях. "Носители" могут представлять собой растворители, суспендирующие агенты или среды-носители для доставки соединений в соответствии с настоящим изобретением субъекту.

В настоящем документе «индивид», «субъект» или «пациент» представляет собой позвоночное. В некоторых вариантах реализации позвоночное представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают приматов (включая человека и приматов, не являющихся человеком) и грызунов (например, мышей и крыс), но не ограничиваются ими. В предпочтительных вариантах реализации субъект представляет собой человека.

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая:

- (а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- 5 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных
- 10 веществ или носителей.

Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии

В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный штамм

15 грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из

20 бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, а гетерологичный белок или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков клеточных сигнальных путей, репортерных

25 белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, связанных с GPCR, нанотел и гибридных конструкторов на основе нанотел, эффекторов бактериальной T3SS, эффекторов бактериальной T4SS и вирусных белков, или их фрагментов.

В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии в

30 соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его

фрагмент, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, а гетерологичный белок или его фрагмент представляют собой белок, участвующий в 5 индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), или его фрагмент.

В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный штамм 10 грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из 15 бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, а гетерологичный белок или его фрагмент представляют собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, или его фрагмент.

Гетерологичный белок или его фрагмент предпочтительно представляет собой белок, 20 участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, или его фрагмент, выбранный из группы, состоящей из белков семейства RIG-I-подобного рецептора (RLR), или их фрагментов, других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусных сигнальных путях и индукции ИФН I типа, или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического 25 ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, выбранных из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, которые приводят к стимуляции STING, или их фрагментов.

Гетерологичный белок или его фрагмент в более предпочтительном случае представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, 30 или его фрагмент, выбранный из группы, состоящей из RIG1, MDA5, LGP2, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагментов, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из RIG1, MAVS, MDA5,

WspR, DncV, DisA-подобного белка и cGAS, или их фрагментов, наиболее предпочтительно выбранный из группы, состоящей из RIG1 или его фрагмента и cGAS или его фрагмента, в частности фрагмент RIG1, содержащий домен CARD, конкретнее фрагмент RIG1, содержащий домен CARD, еще конкретнее фрагмент RIG1, предпочтительно RIG1 человека, содержащий два домена CARD, наиболее конкретно фрагмент RIG1 человека, содержащий два домена CARD, приведенный в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно приведенный в SEQ ID NO: 1, и/или cGAS или его фрагмент, например его фрагменты, описанные выше, в частности cGAS человека или его фрагмент, приведенный в SEQ ID NO: 10.

10

Молекула полинуклеотида, которую содержит штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой вектор, например экспрессирующий вектор. Вектор, содержащий указанную молекулу полинуклеотида, может представлять собой низко-, средне- или высококопийную плазмиду.

15 Низкокопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 1 - 15 копий/бактериальную клетку, предпочтительно 1 - 10 копий/бактериальную клетку. Среднекопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 5 - 200 копий/бактериальную клетку, предпочтительно 10 - 150 копий/бактериальную клетку.

Высококопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 100 - 1000 копий/бактериальную клетку, предпочтительно 150 - 700 копий/бактериальную клетку.

20 В предпочтительном варианте реализации вектор, содержащий молекулу полинуклеотида, представляет собой среднекопийную плазмиду. В предпочтительном варианте реализации вектор представляет собой среднекопийную плазмиду с 5 - 200 копиями/бактериальную клетку, т.е. в одной бактериальной клетке присутствует 5 - 200

25 копий плазмиды, предпочтительно 10 - 150 копий/бактериальную клетку, т.е. в одной бактериальной клетке присутствует 10 - 150 копий плазмиды.

В одном варианте реализации вектор, содержащий молекулу полинуклеотида, представляет собой плазмиду, размер которой без вставки составляет от 1 до 15 кДа, предпочтительно от 2 до 10 кДа, более предпочтительно от 3 до 7 кДа.

30

В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии

представляет собой рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*. В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии предпочтительно представляет собой штамм *Yersinia*, более предпочтительно штамм *Yersinia enterocolitica*. Наиболее предпочтительным является *Yersinia enterocolitica* E40 (O:9, биотип 2) (Sory and Cornelis, 1994) или его чувствительные к ампициллину производные, например *Y. enterocolitica* MRS40 (также называемый *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* MRS40), описанные в источнике (Sarker et al., 1998). *Y. enterocolitica* E40 и его производное *Y. enterocolitica* MRS40, описанное в (Sarker et al., 1998), идентичны *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* E40 и его производному *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* MRS40, описанным в (Howard et al., 2006; Neubauer et al., 2000; Pelludat et al., 2002). Кроме того, рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии предпочтительно представляет собой штамм *Salmonella*, более предпочтительно штамм *Salmonella enterica*. Наиболее предпочтительным является *Salmonella enterica*, серовар Typhimurium SL1344, описанный в коллекции культур Управления здравоохранения Англии (NCTC 13347).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм, не продуцирующий сидерофор, например является дефектным по продукции сидерофора, предпочтительно не продуцирует сидерофоры, например является дефектным по продукции любого сидерофора. Такой штамм представляет собой, например, *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* MRS40, описанный в (Howard et al., 2006; Neubauer et al., 2000; Pelludat et al., 2002; Sarker et al., 1998), который не продуцирует иерсиниабактин и является предпочтительным.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки из

бактериального эффекторного белка включает бактериальный эффекторный белок или его N-концевой фрагмент, предпочтительно бактериальный эффекторный белок, вирулентный в отношении эукариотических клеток, или его N-концевой фрагмент.

- 5 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки из бактериального эффекторного белка представляет собой эффекторный белок бактериальной T3SS, включающий эффекторный белок бактериальной T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент может содержать сайт связывания шаперонов. Эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперонов, является в особенности пригодным в качестве сигнала доставки в настоящем изобретении. Предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из SopE, SopE2, SptP, YopE, ExoS, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, SspH1, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, XopD, AvrRpt2, HopAO1, HopPtoD2, HopU1, белков семейства GALA, AvrBs2, AvrD1, AvrBS3, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и AvrXv3 Более предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из SopE, SptP, YopE, ExoS, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, среди которых наиболее предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из IpgB1, SopE, SopB, SptP, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, в частности YopE или его N-концевого фрагмента.

- В равной степени предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из SopE, SopE2, SptP, SteA, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SifB, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, AvrRpt2, HopAO1, HopU1, белков семейства GALA, AvrBs2, AvrD1,

YopO, YopP, YopE, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphE_{Pto}, AvrPpiB_{Pto}, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и AvrXv3. В равной степени более предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из SopE, SptP, SteA, SifB, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopT, среди которых в равной степени наиболее предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из IpgB1, SopE, SopB, SptP, SteA, SifB, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE и YopT, в частности SopE, SteA или YopE или их N-концевых фрагментов, конкретнее SteA или YopE или их N-концевых фрагментов, наиболее конкретно YopE или его N-концевого фрагмента.

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка кодирует нуклеотидная последовательность, содержащая бактериальный эффекторный белок или его N-концевой фрагмент, причем указанный N-концевой фрагмент содержит по меньшей мере первые 10, предпочтительно по меньшей мере первые 20, более предпочтительно по меньшей мере первые 100 аминокислот эффекторного белка бактериальной T3SS.

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка кодирует нуклеотидная последовательность, содержащая эффекторный белок бактериальной T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок бактериальной T3SS или его N-концевой фрагмент содержит сайт связывания шаперонов.

Предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты, содержащие сайт связывания шаперонов, включают следующие комбинации сайта связывания шаперонов и эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента: SycE-YopE, InvB-SopE, SicP-SptP, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpsS-ExoS, CesF-EspF, SycD-YopB, SycD-YopD. Более предпочтительными являются SycE-YopE, InvB-SopE, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpsS-ExoS, CesF-EspF. Наиболее предпочтительным является YopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперона SycE, например N-

концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, обозначенный в настоящем документе как YopE₁₋₁₃₈ и приведенный в SEQ ID NO: 25, или эффекторный белок SopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперона InvB, например N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 81 или 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка SopE, обозначенный в настоящем документе как SopE₁₋₈₁ или SopE₁₋₁₀₅, соответственно, и приведенный в SEQ ID NO: 26 и 27.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*, а сигнал доставки из бактериального эффекторного белка содержит эффекторный белок YopE или его N-концевой фрагмент, предпочтительно эффекторный белок YopE *Y. enterocolitica* или его N-концевой фрагмент. N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE предпочтительно содержит сайт связывания SycE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE может содержать 12, 16, 18, 52, 53, 80 или 138 N-концевых аминокислот (Feldman et al., 2002; Ittig et al., 2015; Ramamurthi and Schneewind, 2005; Wolke et al., 2011). Наиболее предпочтительным является N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, например описанный в источнике Forsberg и Wolf-Watz (Forsberg и Wolf-Watz, 1990), обозначенный в настоящем документе как YopE₁₋₁₃₈ и приведенный в SEQ ID NO: 25.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Salmonella*, а сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемый нуклеотидной последовательностью, содержит эффекторный белок SopE или SteA или его N-концевой фрагмент, предпочтительно эффекторный белок SopE или SteA *Salmonella enterica* или его N-концевой фрагмент. N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE предпочтительно содержит сайт связывания шаперонов. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE может содержать 81 или 105 N-концевых аминокислот. Наиболее предпочтительным является полноразмерный SteA (SEQ ID NO: 28) и N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 105 N-

концевых аминокислот указанного эффекторного белка, например описанный в SEQ ID NO: 27.

5 Специалисту в данной области техники известны способы идентификации полипептидных последовательностей эффекторного белка, способных выполнять доставку белка. Например, один такой способ описан в источнике Sory et al. (Sory and Cornelis, 1994). Вкратце, полипептидные последовательности, например, из различных фрагментов белков Yop, можно присоединить с соблюдением рамки считывания к репортерному ферменту, например, активируемому кальмодулином аденилатциклазному домену (или Cya) циклолизина *Bordetella pertussis*. О доставке гибридного белка Yop-Cya в цитозоль эукариотических клеток свидетельствует появление циклазной активности в инфицированных эукариотических клетках, которая приводит к накоплению цАМФ. Применяя такой подход, специалист в данной области техники может при необходимости определить минимальное требование к последовательности, т.е. наиболее короткую непрерывную аминокислотную последовательность, способную выполнять доставку белка, см., например, источник (Sory and Cornelis, 1994). Соответственно, предпочтительные сигналы доставки в соответствии с настоящим изобретением состоят из по меньшей мере минимальной аминокислотной последовательности эффекторного белка T3SS, способной выполнять доставку белка.

В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, более предпочтительно является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного в отношении эукариотических клеток, еще более предпочтительно является дефектным по продукции по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, наиболее предпочтительно является дефектным по продукции по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, вирулентного в отношении эукариотических клеток. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий являются дефектными по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, более предпочтительно по меньшей мере трех,

еще более предпочтительно по меньшей мере четырех, в частности по меньшей мере пяти, конкретнее по меньшей мере шести, наиболее конкретно всех бактериальных эффекторных белков, вирулентных в отношении эукариотических клеток. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий являются дефектными по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, более предпочтительно по меньшей мере трех, еще более предпочтительно по меньшей мере четырех, в частности по меньшей мере пяти, конкретнее по меньшей мере шести, наиболее конкретно всех функциональных бактериальных эффекторных белков, вирулентных в отношении эукариотических клеток, так что полученный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии продуцирует меньше бактериальных эффекторных белков или продуцирует бактериальные эффекторные белки в меньшей степени по сравнению с штаммом грамотрицательной бактерии дикого типа с неослабленной вирулентностью, т.е. по сравнению со штаммом грамотрицательной бактерии дикого типа, в норме продуцирующим бактериальные эффекторные белки, или так что полученный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии больше не продуцирует функциональные бактериальные эффекторные белки, вирулентные в отношении эукариотических клеток.

В соответствии с настоящим изобретением такой мутантный штамм грамотрицательной бактерии, т.е. такой рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, например дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного в отношении эукариотических клеток, например такой мутантный штамм *Yersinia* можно получить посредством внедрения по меньшей мере одной мутации в по меньшей мере один ген, кодирующий эффектор. Такие гены, кодирующие эффектор, предпочтительно включают YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ и YopT, если речь идет о штамме *Yersinia*. Такие гены, кодирующие эффектор, предпочтительно включают AvrA, CigR, GogB, GtgA, GtgE, PipB, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopB/SigD, SopA, SpiC/SsaB, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SopD, SopE, SopE2, SspH1, SspH2, PipB2, SifA, SopD2, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SteC, SteA, SteB, SteD, SteE, SpvB, SpvC, SpvD, SrfJ, SptP, если речь

идет о штамме *Salmonella*. В наиболее предпочтительном случае все гены, кодирующие эффектор, делетируют. Специалист в данной области техники может применять любое количество стандартных методик для получения мутаций в данных эффекторных генах T3SS. В руководстве Sambrook et al. в общем виде описаны данные методики. См.

5 Sambrook et al. (Sambrook, 2001).

В соответствии с настоящим изобретением можно сформировать мутацию в области промотора гена, кодирующего эффектор, с целью устранения экспрессии такого эффекторного гена.

Мутацию также можно сформировать в кодирующей области гена, кодирующего эффектор, с целью устранения каталитической активности кодируемого эффекторного белка. «Каталитическая активность» эффекторного белка обычно обозначает функцию эффекторного белка, направленную против клетки-мишени, т.е. токсичность. Такая активность регулируется каталитическими мотивами в каталитическом домене эффекторного белка. Подходы для идентификации каталитического домена и/или каталитических мотивов эффекторного белка хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, (Alto and Dixon, 2008; Alto et al., 2006).

Соответственно, одна предпочтительная мутация в соответствии с настоящим изобретением представляет собой делецию всего каталитического домена. Другая предпочтительная мутация представляет собой мутацию со сдвигом рамки считывания в гене, кодирующем эффектор, приводящую к отсутствию каталитического домена в белковом продукте, экспрессированном с такого гена «со сдвигом рамки считывания». Наиболее предпочтительная мутация представляет собой мутацию с делецией всей кодирующей области эффекторного белка. Настоящее изобретение также предусматривает другие мутации, например небольшие делеции или замены пар оснований, формируемые в каталитических мотивах эффекторного белка и приводящие к нарушению каталитической активности данного эффекторного белка.

Мутации, формируемые в генах функциональных бактериальных эффекторных белков, можно внедрить в конкретный штамм с помощью множества способов. Один из таких способов включает клонирование мутированного гена в вектор-«самоубийцу», способный внедрять мутированную последовательность в штамм в результате

аллельного обмена. Пример такого вектора-«самоубийцы» описан в источнике (Kaniga et al., 1991).

5 Таким образом, в штамм грамотрицательной бактерии можно последовательно
внедрить мутации, сформированные во множестве генов, получая полимутантный,
например шестикратно мутантный рекомбинантный штамм. Порядок внедрения
данных мутантных последовательностей неважен. При определенных условиях могут
потребоваться мутации только в некоторых, но не во всех генах эффекторов.
Соответственно, в настоящем изобретении также рассматривается полимутантный
10 штамм *Yersinia*, отличный от шестикратно мутантного штамма *Yersinia*, например
двукратно мутантный, трехкратно мутантный, четырехкратно мутантный и пятикратно
мутантный штаммы. Для цели доставки белков система секреции и транслокации
настоящего мутантного штамма должна быть интактной.

Предпочтительный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии в
15 соответствии с настоящим изобретением представляет собой шестикратно мутантный
штамм *Yersinia*, в котором все гены, кодирующие эффекторы (представляющие собой
yopH, *yopO*, *yopP*, *yopE*, *yopM*, *yopT*), мутированы, так что полученный в результате
штамм *Yersinia* больше не продуцирует функциональных эффекторных белков. Такой
шестикратно мутантный штамм *Yersinia* обозначают как Δ*yopH,O,P,E,M,T* для *Y.*
20 *enterocolitica*. В качестве примера, такой шестикратно мутант можно получить из
штамма *Y. enterocolitica* MRS40 с получением *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*yopH,O,P,E,M,T*
(также называемого в настоящем документе *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* MRS40
Δ*yopH,O,P,E,M,T* или *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* или *Y. enterocolitica*
Δ*yopHOPEMT* или *Y. enterocolitica* Δ*H,O,P,E,M,T* или *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* или
25 *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*yopHOPEMT* или *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*H,O,P,E,M,T* или
Y. enterocolitica MRS40 Δ*HOPEMT* или *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* MRS40
Δ*yopHOPEMT* или *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* MRS40 Δ*H,O,P,E,M,T* или *Y.*
enterocolitica subsp. *palaearctica* MRS40 Δ*HOPEMT*), который является
предпочтительным. *Y. enterocolitica* MRS40 Δ*yopH,O,P,E,M,T*, дефектный по продукции
30 иерсиниабактина, описан в публикации WO02077249 и был депонирован 24 сентября
2001 года согласно Будапештскому договору о международном признании
депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в бельгийских

Согласованных коллекциях микроорганизмов (ВССМ); данному штамму присвоен учетный номер LMG P-21013.

В равной степени предпочтительным является *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т, содержащий делецию на эндогенной плазмиде вирулентности pYV, устранившую шпилечную структуру РНК или ее фрагменты, например делеция шпильки I, расположенной до гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AgaC (ΔHairpinI-virF), например *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т ΔHairpinI-virF (также называемый *Y. enterocolitica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т ΔHairpinI-virF). В равной степени предпочтительным является *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т, содержащий делецию хромосомного гена, кодирующего *asd*, и эндогенную плазмиду вирулентности pYV, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую ген, кодирующий *asd*, функционально связанный с промотором (pYV-*asd*), например *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* pYV-*asd* (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* pYV-*asd*). В особенности предпочтительным является *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* ΔHairpinI-virF pYV-*asd*, содержащий обе вышеописанные модификации (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* ΔHairpinI-virF pYV-*asd*). В особенности предпочтительными штаммами являются *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т ΔHairpinI-virF (также называемый *Y. enterocolitica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т ΔHairpinI-virF), *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* pYV-*asd* (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* pYV-*asd*) или *Y. enterocolitica* MRS40 ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* ΔHairpinI-virF pYV-*asd* (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* ΔHairpinI-virF pYV-*asd*), которые являются дефектными по продукции сидерофора, предпочтительно не продуцируют сидерофоры, например являются дефектными по продукции любого сидерофора, как в случае всех штаммов *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica*. Таким образом, в равной степени особенно предпочтительными штаммами являются *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т ΔHairpinI-virF (также называемый *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т ΔHairpinI-virF), *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* pYV-*asd*, также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* pYV-*asd*) или *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* ΔуорН,О,Р,Е,М,Т Δ*asd* ΔHairpinI-virF pYV-*asd* (также

называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHairpinI-virF pYV-asd).

Наиболее предпочтительным является шестикратно мутантный штамм *Yersinia enterocolitica*, обозначаемый как ΔyopH,O,P,E,M,T.

5

Полинуклеотидные конструкции, например векторы, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением для трансформации штамма грамотрицательной бактерии, зависят от используемых штаммов грамотрицательных бактерий, как известно специалисту в данной области техники. Полинуклеотидные

10

конструкции, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают экспрессирующие векторы (включая синтетические или полученные иным способом модифицированные версии эндогенных плазмид вирулентности), векторы для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности и такие нуклеотидные последовательности, как, например, фрагменты ДНК для вставки в хромосому или в

15

плазмиду вирулентности. Экспрессирующие векторы, пригодные, например, для штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, представляют собой, например, плазмиды pUC, pBad, pACYC, pUCP20 и pET. Векторы для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, пригодные, например, для штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, представляют собой, например, pKNG101.

20

Вставка фрагментов ДНК в хромосому или в плазмиду вирулентности относится к способам, применяемым, например, в штамме *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например генетической инженерии с использованием lambda-red.

Векторы для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности или фрагменты ДНК для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности могут выполнять вставку

25

нуклеотидной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, так что, например нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с эндогенным промотором рекомбинантного штамма

30

грамотрицательной бактерии. Таким образом, при применении вектора для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности или фрагмента ДНК для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности эндогенный промотор может кодировать

эндогенная бактериальная ДНК (хромосомная или плазмидная ДНК), и только соответствующая нуклеотидная последовательность находится на сконструированном векторе для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, либо на фрагменте ДНК для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности. В качестве альтернативы, при применении вектора для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности или полинуклеотидного конструкта, например нуклеотидной последовательности для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, эндогенный промотор и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка может кодировать эндогенная бактериальная ДНК (хромосомная или плазмидная ДНК), и только полинуклеотидный конструкт, например нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, находится на векторе для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, либо на полинуклеотидном конструкте, например, нуклеотидной последовательности для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности. Таким образом, не требуется, чтобы вектор, применяемый для трансформации рекомбинантных штаммов грамотрицательных бактерий обязательно содержал промотор, т.е. рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением можно трансформировать вектором, не содержащим промотора.

Предпочтительный вектор, например предпочтительный экспрессирующий вектор для *Yersinia*, выбран из группы, состоящей из pBad_Si_1, pBad_Si_2 и pT3P-715, pT3P-716 и pT3P-717. pBad_Si2 сконструирован путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE, из очищенного pYV40 в сайт KpnI/HindIII pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglII pBad-MycHisA путем гидролиза, обработку фрагментом Кленова и повторное лигирование. Дополнительно на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ добавлены следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI- (HindIII). pBad_Si1 аналогична pBad_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech) в сайте NcoI/BglII под контролем индуцируемого арабинозой промотора. В равной степени предпочтительным является применение модифицированных версий эндогенной плазмиды вирулентности pYV *Yersinia*, кодирующих гетерологичные белки в виде гибридов с сигнальной последовательностью T3SS.

Предпочтительный вектор, например предпочтительный экспрессирующий вектор для *Salmonella*, выбран из группы, состоящей из pTZP_267, pTZP_268 и pTZP_269. Плазмиды pTZP_267, pTZP_268 и pTZP_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и полноразмерную последовательность SteA (pTZP_267), фрагмент SopE₁₋₈₁ (pTZP_268) или фрагмент SopE₁₋₁₀₅ (pTZP_269), амплифицировали из геномной ДНК SL1344 *S. enterica* и клонировали в сайт NcoI/KpnI pBad-MycHisA (Invitrogen).

5 pTZP-715 представляет собой полностью синтетическую плазмиду (вектор, синтезированный de-novo) со свойствами, аналогичными pSi_2, при этом соответствующая кодирующая область AraC удалена, а ген устойчивости к ампициллину (плюс 70 п.о. перед ним) заменен геном устойчивости к хлорамфениколу с областью 200 п.о. до него. Для ясности, pTZP-715 содержит фрагмент SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащий эндогенные промоторы для YopE и SycE из pYV40, причем на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ добавлены следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI-HindIII. Она содержит сайт инициации репликации pBR322 и хлорамфениколацетилтрансферазу (cat) из мобильного генетического элемента Tn9 (Alton and Varnek, 1979).

15 pBad_Si2 и pTZP-715 представляют собой среднекопийные плазмиды с сайтом инициации репликации pBR322 (pMB1) (SEQ ID NO: 29).

Производное pTZP-716 представляет собой высококопийную плазмиду, полученную в результате точечной мутации в сайте инициации репликации pBR322 (SEQ ID NO: 29), что привело к получению сайта инициации репликации ColE1 (SEQ ID NO: 30). Высококопийные плазмиды для экспрессии и доставки гетерологичных белков-грузов получены на основе pTZP-716.

25 Производное pTZP-717 представляет собой низкокопийную плазмиду, полученную на основе сайта инициации репликации pBR322, аналогично pTZP-715, но дополнительно содержащую ген gor ("репрессор праймера") (SEQ ID NO: 31). Низкокопийные плазмиды для экспрессии и доставки гетерологичных белков-грузов получены на основе pTZP-717.

30 Молекулы полинуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением могут содержать другие элементы последовательности, например 3'-последовательность терминации (включая стоп-кодон и поли(A)-последовательность) или ген, придающий устойчивость к лекарственным средствам, позволяющий выполнять селекцию

трансформантов, получивших указанные молекулы полинуклеотидов, или другой элемент, позволяющий выполнять селекцию трансформантов. Рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий можно трансформировать молекулами полинуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением множеством известных способов. Для целей настоящего изобретения способы трансформации с целью введения молекул полинуклеотидов включают электропорацию, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, конъюгацию или их комбинации, но не ограничиваются ими. Например, молекулами полинуклеотидов, например расположенными на векторе, можно трансформировать первый штамм бактерии с помощью стандартной процедуры электропорации. Затем такую молекулу полинуклеотида, например расположенную на векторе, можно перенести из первого штамма бактерии в требуемый штамм путем конъюгации - процесса, также называемого «мобилизацией». Можно выполнять селекцию трансформанта (т.е. штаммов грамотрицательной бактерии, принявших вектор), например, с помощью антибиотиков. Данные методики хорошо известны в данной области техники. См., например, источник (Soyu and Cornelis, 1994).

В соответствии с настоящим изобретением промотор, функционально связанный с бактериальным эффекторным белком рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой нативный промотор эффекторного белка T3SS соответствующего штамма или совместимого штамма бактерии, или другой нативный промотор соответствующего или совместимого штамма бактерии, или промотор, применяемый в экспрессирующих векторах, пригодных, например, для штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например pUC и pBad. Такие промоторы представляют собой промотор T7, промотор Plac или индуцируемый арабинозой промотор Ara-bad. Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*, промотор можно получить из гена вирулона *Yersinia*. «Ген вирулона *Yersinia*» обозначает гены, расположенные на плазмиде pYV *Yersinia*, экспрессия которых контролируется как температурой, так и контактом с клеткой-мишенью. Такие гены включают гены, кодирующие элементы аппарата секреции (гены Ysc), гены, кодирующие транслокаторы (YopB, YopD и LcrV), гены, кодирующие контрольные

элементы (YopN, YueA и LcrG), гены, кодирующие шапероны эффекторных T3SS (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO и SycT), и гены, кодирующие эффекторы (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT и YopP/YopJ), а также другие белки, кодируемые pYV, например VirF и YadA.

5 В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор T3SS. Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*, то промотор выбирают из промоторов любого из YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM и YopP/YopJ. Более предпочтительно промотор получают из YopE
10 и/или YopH. Наиболее предпочтительными являются промотор YopE и промотор YopH, соответственно.

Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Salmonella*, то промотор можно получить из острова патогенности SpiI или SpiII или из эффекторного белка, кодируемого другим локусом. Такие гены включают гены,
15 кодирующие элементы аппарата секреции, гены, кодирующие транслокаторы, гены, кодирующие контрольные элементы, гены, кодирующие шапероны эффекторных T3SS, и гены, кодирующие эффекторы, а также другие белки, кодируемые SPI-1 или SPI-2. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор
20 T3SS. Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Salmonella*, то промотор выбирают из промоторов любого из эффекторных белков. Более предпочтительно промотор получают из SopE, InvB или SteA.

В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой искусственно индуцируемый промотор, например промотор, индуцируемый IPTG, промотор,
25 индуцируемый светом, и промотор, индуцируемый арабинозой.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления протеазой. Сайт расщепления протеазой обычно
30 расположен на полинуклеотидной молекуле, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности,

кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, между нуклеотидной последовательностью, кодирующей гетерологичный белок, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнал доставки. Получение функционального и в общем виде применимого сайта расщепления позволяет отщеплять сигнал доставки после транслокации. Поскольку сигнал доставки может препятствовать правильной локализации и/или функционированию транслоцированного белка в клетках-мишенях, введение сайта расщепления протеазой между сигналом доставки и белком, представляющим интерес, обеспечивает доставку почти нативных белков в эукариотические клетки. Сайт расщепления протеазой предпочтительно представляет собой аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы 3С риновируса человека, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Ха и тромбина, более предпочтительно аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой TEV. В равной степени предпочтительный сайт расщепления протеазой представляет собой аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы 3С риновируса человека, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Ха, убиквитин-процессирующей протеазы, называемой деубиквитинизирующими ферментами, и тромбина. Наиболее предпочтительным является аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой TEV или убиквитин-процессирующей протеазой.

Таким образом, в дополнительном варианте реализации настоящего изобретения гетерологичный белок отщепляется протеазой от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка. Предпочтительными способами отщепления являются способы, в которых:

- a) протеазу транслоцирует в эукариотическую клетку рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, описанный в настоящем документе, экспрессирующий гибридный белок, содержащий сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и протеазу в качестве гетерологичного белка; или
- b) протеаза конститутивно или временно экспрессируется в эукариотической клетке. Обычно рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, применяемый для

доставки желательного белка в эукариотическую клетку, и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, транслоцирующий протеазу в эукариотическую клетку, отличаются друг от друга.

5 В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения. Дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения, обычно присоединена к 5'-концу или 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. Предпочтительная молекула для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения выбраны из группы, состоящей из усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP), кумарина, акцепторного сайта кумаринлигазы, резорурфина, акцепторного сайта резорурфинлигазы, тетрацистеинового мотива, применяемого с красителем F1AsH/ReAsH (Life Technologies). Наиболее предпочтительным является резорурфин и акцепторный сайт резорурфинлигазы или EGFP. Применение молекулы для мечения или акцепторного сайта для молекулы для мечения приводит к присоединению молекулы для мечения к гетерологичному белку, представляющему интерес, который затем доставляют в таком виде в эукариотическую клетку, и позволяет отслеживать этот белок, например посредством микроскопии живых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидный маркер. Дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая пептидный маркер, обычно присоединена к 5'-концу или 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. Предпочтительный пептидный маркер выбран из группы, состоящей из маркера Muc, маркера His, маркера Flag, маркера HA, маркера Strep или маркера V5 или комбинации двух или более маркеров из данной группы. Наиболее предпочтительными являются маркер Muc, маркер Flag, маркер His и комбинация маркеров Muc и His. Применение пептидного маркера позволяет отслеживать белок, несущий данный маркер, например с

помощью иммунофлуоресценции или вестерн-блоттинга с применением антител против метки. Кроме того, применение пептидного маркера позволяет выполнять аффинную очистку желательного белка после секреции в супернатант культуры или после транслокации в эукариотические клетки, в обоих случаях с применением способа
5 очистки, подходящего для соответствующего маркера (например, металл-хелатной аффинной очистки при применении с маркером His или очистки на основе антитела против Flag при применении с маркером Flag).

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм
10 граммотрицательной бактерии содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS). Дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS), обычно присоединяют к 5'-концу или 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок, причем указанная
15 дополнительная нуклеотидная последовательность кодирует сигнал ядерной локализации (NLS). Предпочтительный NLS выбран из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 и его производных (Yoneda et al., 1992), а также других вирусных NLS. Наиболее предпочтительным является NLS большого Т-антигена SV40 и его производные.

20 В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм граммотрицательной бактерии содержит сайт множественного клонирования. Сайт множественного клонирования обычно расположен на 3'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного
25 белка, и/или на 5'-конце или 3'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. Вектор может содержать один или более одного сайта множественного клонирования. Предпочтительный сайт множественного клонирования выбран из группы сайтов ферментов рестрикции, состоящей из сайтов XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. Наиболее
30 предпочтительными являются сайты XbaI, XhoI, BstBI и HindIII.

Белок, экспрессируемый рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением, также называют «белком-гибридом» или «гибридным белком», т.е. он представляет собой гибридный белок или гибридный сигнал доставки и гетерологичного белка. Гибридный белок может также содержать, например, сигнал доставки и два или более различных гетерологичных белков. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии экспрессирует по меньшей мере два гибридных белка, каждый из которых содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, которые транслоцируют в эукариотическую клетку, например клетку рака, с помощью способов в соответствии с настоящим изобретением.

Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии можно культивировать, обеспечивая экспрессию гибридного белка, содержащего сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, в соответствии со способами, известными в данной области техники (например, см. FDA, *Bacteriological Analytical Manual (BAM), chapter 8: Yersinia enterocolitica*). Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии предпочтительно можно культивировать в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, например при температуре 28 °C. Для индукции экспрессии T3SS и, например, генов, зависящих от промотора YopE/SycE, бактерии можно выращивать при температуре 37 °C.

Специалисты в данной области техники могут также применять множество вариантов анализа для определения успешности доставки гетерологичного белка, например гибридного белка, рекомбинантными грамотрицательными бактериями. Например, гибридный белок можно обнаружить с помощью иммунофлуоресценции с применением антител, распознающих присоединенный маркер (например, маркер Muc). Определение также может основываться на ферментативной активности доставляемого белка, например как в анализе, описанном в источнике (Sory and Cornelis, 1994).

В предпочтительном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной

бактерии в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий

- i) первую молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
 - 5 ii) вторую молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
 - 10 iii) третью молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором; и
 - 15 iv) четвертую молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного
 - 20 белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором,
- причем указанная первая и указанная вторая молекулы полинуклеотидов расположены на векторе, который содержит указанный штамм грамотрицательной бактерии, а
- 30 указанная третья и указанная четвертая молекулы полинуклеотидов расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательной бактерии или на внехромосомном генетическом элементе, который содержит указанный штамм грамотрицательной

бактерии, при условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая молекулы полинуклеотидов.

- 5 В одном варианте реализации третья и четвертая молекулы полинуклеотидов расположены на эндогенной плазмиде вирулентности, предпочтительно расположены на эндогенной плазмиде вирулентности в нативном сайте бактериального эффекторного белка, например в нативном сайте фактора вирулентности, причем, предпочтительно, в случае, если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии
- 10 представляет собой штамм *Yersinia*, в нативном сайте YopE и/или YopN или в нативном сайте другого Yop (YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительно в нативном сайте YopE и YopN, соответственно, или в случае, если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Salmonella*, в нативном сайте эффекторного белка, кодируемого в SpiI, SpiII или в другом локусе, предпочтительно в
- 15 нативном сайте эффекторного белка, кодируемого в SpiI или SpiII, более предпочтительно в нативном сайте SopE или SteA.

В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность первой молекулы полинуклеотида, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, и нуклеотидная

20 последовательность третьей молекулы полинуклеотида, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент.

В дополнительном варианте реализации нуклеотидная последовательность второй молекулы полинуклеотида, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, и

25 нуклеотидная последовательность четвертой молекулы полинуклеотида, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент.

В предпочтительном варианте реализации нуклеотидная последовательность первой

30 молекулы полинуклеотида, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, и нуклеотидная последовательность третьей молекулы полинуклеотида, кодирующая

гетерологичный белок или его фрагмент, кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент, а

нуклеотидная последовательность второй молекулы полинуклеотида, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, и нуклеотидная последовательность четвертой молекулы полинуклеотида, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, причем гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый первой и третьей молекулами полинуклеотида, отличается от гетерологичного белка или его фрагмента, кодируемого второй и четвертой молекулами полинуклеотида.

10

В более предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый нуклеотидной последовательностью первой и третьей молекул полинуклеотидов независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из белков семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR) или их фрагментов, других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусных сигнальных путях и индукции ИФН I типа, или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, выбранных из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, приводящих к стимуляции STING, или их фрагментов, как описано выше. Еще более предпочтительно, гетерологичный белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью первой и третьей молекул полинуклеотидов независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагментов, как описано выше. В частности, гетерологичный белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью первой и третьей молекул полинуклеотидов, представляет собой cGAS или его фрагмент, например его фрагменты, описанные выше, конкретнее cGAS человека или его фрагмент, приведенный в SEQ ID NO: 10.

20

В более предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый нуклеотидной последовательностью второй и четвертой молекул полинуклеотидов независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из белков семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR) или их фрагментов, других белков,

30

содержащих домен CARD, участвующих в противовирусных сигнальных путях и индукции ИФН I типа, или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, выбранных из группы, состоящей из WspR, DncV, 5 DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, приводящих к стимуляции STING, или их фрагментов, как описано выше. Еще более предпочтительно, гетерологичный белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью второй и четвертой молекул полинуклеотидов независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их 10 фрагментов. В частности, гетерологичный белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью второй и четвертой молекул полинуклеотидов независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка и CdaA или их фрагментов. Конкретнее, гетерологичный белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью второй и четвертой молекул 15 полинуклеотидов, представляет собой RIG1 или его фрагмент, описанный выше, конкретнее фрагмент RIG1, содержащий домен CARD, еще конкретнее фрагмент RIG1, предпочтительно RIG1 человека, содержащий два домена CARD, наиболее конкретно фрагмент RIG1 человека, содержащий два домена CARD, как показано в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, предпочтительно, как показано в SEQ ID NO: 1.

20 В некоторых вариантах реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка первой, второй, третьей и четвертой молекул полинуклеотидов представляет собой один и тот же сигнал доставки. В предпочтительном варианте реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка первой, второй, третьей и четвертой 25 молекул полинуклеотидов представляет собой сигнал доставки из бактериального эффекторного белка T3SS, предпочтительно один и тот же сигнал доставки из бактериального эффекторного белка T3SS. В более предпочтительном варианте реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка первой, второй, третьей и четвертой молекул полинуклеотидов содержит эффекторный белок YopE или 30 его N-концевой фрагмент.

В одном варианте реализации каждая из нуклеотидной последовательности,

кодирующей гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенной с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности первой молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, и нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок или его
5 фрагмент, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности второй молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связаны с одним и тем же промотором. Термин «каждая из последовательностей функционально связана с одним и тем же промотором» в таком контексте означает, что один промотор (один и тот же
10 промотор) управляет экспрессией гетерологичных белков с первой и второй молекул полинуклеотидов. В предпочтительном варианте реализации каждая из нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности первой молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки
15 из бактериального эффекторного белка, и нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности второй молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связаны с одним и тем же промотором YopE.

20
В дополнительном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности третьей молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка,
25 и нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности четвертой молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связаны с двумя различными промоторами. В предпочтительном варианте реализации нуклеотидная
30 последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности третьей молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки

из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором ΥopE , а нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности четвертой молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором ΥopH .

В следующем предпочтительном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности первой молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, и нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности второй молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связаны с одним и тем же промотором, а нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности третьей молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, и нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенная с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности четвертой молекулы полинуклеотида, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связаны с двумя различными промоторами.

Вектор, содержащий указанные первую и вторую молекулы полинуклеотидов, может представлять собой низко-, средне- или высококопийную плазмиду. Низкокопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 1 - 15 копий/бактериальную клетку, предпочтительно 1 - 10 копий/бактериальную клетку. Среднекопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 5 - 200 копий/бактериальную клетку, предпочтительно 10 - 150 копий/бактериальную клетку. Высококопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 100 - 1000 копий/бактериальную клетку,

предпочтительно 150 - 700 копий/бактериальную клетку.

В предпочтительном варианте реализации вектор, содержащий указанные первую и вторую молекулы полинуклеотидов, представляет собой среднекопийную плазмиду. В предпочтительном варианте реализации вектор представляет собой среднекопийную плазмиду с 5 - 200 копиями/бактериальную клетку, т.е. в одной бактериальной клетке присутствует 5 - 200 копий плазмиды, предпочтительно 10 - 150 копий/бактериальную клетку, т.е. в одной бактериальной клетке присутствует 10 - 150 копий плазмиды.

В одном варианте реализации вектор, содержащий указанные первую и вторую молекулы полинуклеотидов, представляет собой плазмиду, размер которой без вставки составляет от 1 до 15 кДа, предпочтительно от 2 до 10 кДа, более предпочтительно от 3 до 7 кДа.

В одном варианте реализации внехромосомный генетический элемент представляет собой эндогенную плазмиду вирулентности, предпочтительно эндогенную плазмиду вирулентности, естественным образом (в природе) кодирующую белки системы секреции III типа. В предпочтительном варианте реализации указанный внехромосомный генетический элемент представляет собой эндогенную плазмиду вирулентности pYV.

20

Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии в соответствии с настоящим изобретением можно получить путем

1) трансформирования штамма грамотрицательной бактерии молекулой полинуклеотида, предпочтительно молекулой ДНК-полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, и нуклеотидную последовательность, гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанный сигнал доставки из бактериального эффекторного белка или его фрагмент кодирует хромосома или эндогенная плазида вирулентности указанного штамма грамотрицательной

30

бактерии. Нуклеотидная последовательность, гомологичная или идентичная нуклеотидной последовательности сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту, предпочтительно расположена на 5'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок.

5 Нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, может быть фланкирована на 3'-конце нуклеотидной последовательностью, гомологичной нуклеотидной последовательности хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. Эта нуклеотидная последовательность,

10 фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, может быть гомологична нуклеотидной последовательности, лежащей в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Эта нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, может

15 быть гомологичной нуклеотидной последовательности и находиться в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка или его фрагмент. Трансформацию обычно выполняют так, чтобы нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, была вставлена в

20 эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, предпочтительно эндогенную плазмиду вирулентности, с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемого хромосомой или эндогенной плазмидой вирулентности, причем происходит экспрессия и секреция гетерологичного белка, присоединенного к сигналу доставки;

25

2) После этапа 1) (или параллельно ему) рекомбинантный штамм бактерии можно трансформировать дополнительной молекулой полинуклеотида, предпочтительно молекулой ДНК-полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, и нуклеотидную

30 последовательность, гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или гомологичную или идентичную нуклеотидной

последовательности, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанный сигнал доставки из бактериального эффекторного белка или его фрагмент кодирует хромосома или эндогенная плаزمида вирулентности указанного штамма грамотрицательной бактерии.

5 Нуклеотидная последовательность может быть гомологична или идентична нуклеотидной последовательности сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту и расположена на 5'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. Нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, может быть

10 фланкирована на 3'-конце нуклеотидной последовательностью, гомологичной нуклеотидной последовательности хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. Эта нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, может быть гомологична нуклеотидной

15 последовательности, лежащей в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Эта нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, может быть гомологичной нуклеотидной последовательности и находиться в пределах

20 того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка или его фрагмент. Трансформацию обычно выполняют так, чтобы нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, была вставлена в эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому рекомбинантного штамма

25 грамотрицательной бактерии, предпочтительно эндогенную плазмиду вирулентности, с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемого хромосомой или эндогенной плазмидой вирулентности, причем происходит экспрессия и секреция гетерологичного белка, присоединенного к сигналу доставки; и/или

30 3) Рекомбинантный штамм бактерии можно генетически трансформировать одним или двумя полинуклеотидными конструктами, например экспрессирующим вектором, содержащим одну (в случае двух векторов) или две (в случае одного

вектора) нуклеотидную(ых) последовательность(и), кодирующую(ие) гетерологичный белок, и нуклеотидную последовательность, гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка.

Если рекомбинантный штамм бактерии, полученный в соответствии с этапами 1) и 2), трансформируют на этапе 3) одним вектором, содержащим две нуклеотидных последовательности, каждая из которых кодирует гетерологичный белок, и нуклеотидную последовательность, гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, эти две последовательности можно объединить с образованием оперона.

Порядок этапов 1 - 3) можно изменять, или эти этапы можно объединить, или можно выполнять только отдельные этапы. Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*, эндогенная плазмида вирулентности представляет собой pYV (плазмиду вирулентности *Yersinia*). Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Salmonella*, эндогенное положение для вставки представляет собой один из кластеров генов, называемых SpiI или SpiII (для острова патогенности *Salmonella*), положение, при котором эффекторный белок кодируется другим локусом или, в качестве альтернативы, одну из плазмид вирулентности *Salmonella* (SVP).

25

Модуляторы иммунных контрольных точек

В одном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9 (галектина 9), TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектина-2 (CD112 или PVRL2), PVRIG, PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111),

DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96), VISTA (B7-H5), IDO, OX40 (CD134), OX40L (CD252), CD137 (41BB), Cd137L (41BB-L), ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1), KIR, белков KIRDS (KIR2DSs и KIR3DSs), белков KIRDL (KIR2DLs и KIR3DLs), A2aR, CD27, CD70 (CD27L), BTLA, HVEM, GITR, GITRL, CD40, CD40L (CD154), TIM-1, CEACAM1, ICAM, LFA-1, CD2, CD160, HVEM, CD226, Cd112, PIR-B (gp49B), CD85J, CD85D, CD85A, CD85K, CD85C (LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8); ILT2, ILT4, ILT5, ILT3, SIRP-альфа, CD47, GARP, TGF-бета1, TDO, CD94, NKG2A, HLA-E, CSF1, CSF1R, 2B4 (CD244), CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2). Термины в скобках относятся к синонимам соответствующих белков, которые указаны для удобства. В качестве примера, CD154 является синонимом CD40L, который, таким образом, указан как CD40L (CD154). Перечень синонимов не является исчерпывающим, и для многих иммунных контрольных точек существуют дополнительные синонимы.

В предпочтительном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9, TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRIG), VISTA (B7-H5) и IDO.

В более предпочтительном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой активатор или ингибитор иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2, в частности активатор или ингибитор иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1 и PD-L1.

В еще более предпочтительном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2, в частности ингибитор иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1 и PD-L1.

В конкретном предпочтительном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой антагонист PD-1 или антагонист CTLA-4. Антагонист PD-1 предпочтительно представляет собой антагонистическое антитело против PD-1, антагонистическое антитело против PDL-1 или антагонистическое антитело против PDL-2, более предпочтительно антагонистическое антитело против PD-1 или антагонистическое антитело против PDL-1. Антагонист CTLA-4 предпочтительно представляет собой антагонистическое антитело против CTLA-4. В частности, модулятор иммунной контрольной точки выбран из группы, состоящей из антагонистического антитела против PD-1, антагонистического антитела против PDL-1, антагонистического антитела против PDL-2 и антагонистического антитела против CTLA-4, конкретнее модулятор иммунной контрольной точки представляет собой антагонистическое антитело против PD-1, антагонистическое антитело против PDL-1 и/или антагонистическое антитело против CTLA-4, еще конкретнее модулятор иммунной контрольной точки представляет собой антагонистическое антитело против PD-1 и/или антагонистическое антитело против CTLA-4.

В конкретнеем предпочтительном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой антагонистическое антитело против PD-1, выбранное из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, цемиплимаба, тислелизумаба, торипалимаба, камрелизумаба, синтилимаба, ретифанлимаба, пролголимаба (BCD-100), серплулимаба (HLX10), спартализумаба, АК105, авелумаба, атезолизумаба, дурвалумаба и сугемалимаба, и/или антагонистическое антитело против CTLA-4, выбранное из группы, состоящей из ипилимумаба и тремелимумаба.

В одном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой антитело. В предпочтительном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из химерного антитела, гуманизированного антитела и полностью человеческого антитела, более предпочтительно гуманизированного антитела или полностью человеческого антитела.

В одном варианте реализации модулятор иммунной контрольной точки представляет

собой антагонистическое антитело против PD-1, антагонистическое антитело против PDL-1, антагонистическое антитело против PDL-2 или антагонистическое антитело против CTLA-4, причем указанное антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело, предпочтительно гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

Комбинации

Фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением представляет собой, например, комбинированный препарат или фармацевтическую композицию для одновременного, отдельного или последовательного применения.

Термин «комбинированный препарат» в настоящем документе определяет, в частности, «составной набор» в том смысле, что указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и указанный модулятор иммунной контрольной точки можно вводить независимо друг от друга, отдельно либо с применением различных фиксированных комбинаций с различными количествами действующих веществ. Отношение количества рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии к количеству модулятора иммунной контрольной точки, вводимых в комбинированном препарате, может варьироваться, например, для удовлетворения потребностей субпопуляции пациентов, подлежащих лечению, или потребностей одного пациента, которые могут зависеть от возраста, пола, массы тела и т. д. пациента. Отдельные части комбинированного препарата (составного набора) можно вводить одновременно или последовательно, т.е. в хронологическом порядке, например в различные моменты времени и с равными или различными временными интервалами для любой части указанного составного набора.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к комбинации с фиксированной дозой (FDC), включающей рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и модулятор иммунной контрольной точки, объединенные в одну лекарственную форму с заданной комбинацией соответствующих дозировок.

Фармацевтическую комбинацию также можно применять в качестве дополнительной терапии. В данном контексте «добавка» или «дополнительная терапия» означает совокупность реагентов для применения в терапии, причем субъект, получающий терапию, начинает первую схему лечения одним или более реагентами до начала второй схемы лечения одним или более другими реагентами в дополнение к первой схеме лечения, так что применение не всех реагентов, используемых в терапии, начинают одновременно. Например, добавление терапии модулятором иммунной контрольной точки пациенту, уже получающему терапию штаммом грамотрицательной бактерии.

10

В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением представляет собой комбинированный препарат.

15 Количество вводимого рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии и модулятора иммунной контрольной точки зависит от таких факторов, как конкретное соединение, патологическое состояние и его тяжесть, в соответствии с конкретными обстоятельствами, характерными для данного случая, включая, например, конкретный вводимый рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, путь введения, состояние, подлежащее лечению, область-мишень, подлежащую лечению, и субъекта или хозяина, подлежащего лечению.

20

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и модулятор иммунной контрольной точки (ИСТ), причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и указанный модулятор иммунной контрольной точки присутствуют в терапевтически эффективном количестве.

25

В настоящем документе выражение «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, способному вызывать один или более из следующих эффектов у субъекта, получающего комбинацию в соответствии с настоящим изобретением: (i) ингибирование или остановку роста опухоли, включая

30

снижение скорости роста опухоли или полную остановку роста; (ii) полную регрессию опухоли; (iii) уменьшение размера опухоли; (iv) уменьшение количества опухолей; (v) ингибирование метастазирования (т.е. снижение, замедление или полную остановку) инфильтрации опухолевых клеток в периферические органы; (vi) усиление противоопухолевого иммунного ответа, которое может, но не обязательно должно приводить к регрессии или устранению опухоли; (vii) облегчение, в некоторой степени, одного или более симптомов, ассоциированных с раком; (viii) увеличение выживаемости без прогрессирования (ВБП) и/или; общую выживаемость (ОВ) субъекта, получающего указанную комбинацию.

10

Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах возможностей специалистов в данной области техники, особенно в свете подробного описания, представленного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество может (i) уменьшать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, задерживать, замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (например, замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) задерживать возникновение и/или рецидив опухоли; и/или (vii) облегчать до некоторой степени один или более симптомов, ассоциированных с раком. В различных вариантах реализации указанное количество является достаточным для облегчения, смягчения, уменьшения и/или отсрочки одного или более симптомов рака.

15

20

25

В еще одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и модулятор иммунной контрольной точки (ИКТ), причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и указанный модулятор иммунной контрольной точки присутствуют в количестве, вызывающем аддитивный терапевтический эффект.

30

В настоящем документе термин «аддитивный» означает, что эффект, достигаемый с помощью фармацевтических комбинаций в соответствии с настоящим изобретением,

представляет собой приблизительно сумму эффектов, возникающих в результате применения указанных противораковых агентов, а именно рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии и модулятора иммунной контрольной точки, в качестве монотерапии.

5

В еще одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и модулятор иммунной контрольной точки (ICM), причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и указанный модулятор иммунной контрольной точки присутствуют в количестве, вызывающем синергический терапевтический эффект.

10

В настоящем документе термин «синергический» означает, что эффект, достигаемый с помощью фармацевтических комбинаций в соответствии с настоящим изобретением, превышает сумму эффектов, возникающих в результате применения указанных противораковых агентов, а именно рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии и модулятора иммунной контрольной точки, в качестве монотерапии. Такая синергия предпочтительно обеспечивает повышенную эффективность при тех же дозах и может приводить к большей продолжительности ответа на терапию.

15

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая модулятор иммунной контрольной точки (ICM) и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, причем количество указанного модулятора иммунной контрольной точки в комбинации составляет от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мг.

20

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, содержащая модулятор иммунной контрольной точки (ICM) и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, причем количество указанного ингибитора антиапоптотического белка в комбинации составляет от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий.

30

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

- (а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;
- причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*; и причем ICM представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9 (галектина 9), TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRL2), PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111), DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96), VISTA (B7-H5), IDO, OX40 (CD134), OX40L (CD252), CD137 (41BB), Cd137L (41BB-L), ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1), KIR, белков KIRDS (KIR2DSs и KIR3DSs), белков KIRDL (KIR2DLs и KIR3DLs), A2aR, CD27, CD70 (CD27L), BTLA, HVEM, GITR, GITRL, CD40, CD40L (CD154), TIM-1, CEACAM1, ICAM, LFA-1, CD2, CD160, HVEM, CD226, Cd112, PIR-B (gp49B), CD85J, CD85D, CD85A, CD85K, CD85C (LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8); ILT2, ILT4, ILT5, ILT3, SIRP-альфа, CD47, GARP, TGF-бета1, TDO, CD94, NKG2A, HLA-E, CSF1, CSF1R, 2B4 (CD244), CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

- (a) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- 5 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных
- 10 веществ или носителей;
- причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*; и
- причем ICM представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или
- 15 CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9, TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRIG), VISTA (B7-H5) и IDO.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация,

20 содержащая:

- (a) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал
- 25 доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных
- 30 веществ или носителей;
- причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*; и

причем ICM представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9 (галектина 9), TIM3-L, B7-H3 (CD276),
 5 B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRL2), PVRIG, PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111), DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96), VISTA (B7-H5),IDO, OX40 (CD134), OX40L (CD252), CD137 (41BB), Cd137L (41BB-L), ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1), KIR, белков KIRDS (KIR2DSs и KIR3DSs), белков KIRDL (KIR2DLs и KIR3DLs), A2aR, CD27, CD70 (CD27L), BTLA,
 10 HVEM, GITR, GITRL, CD40, CD40L (CD154), TIM-1, CEACAM1, ICAM, LFA-1, CD2, CD160, HVEM, CD226, Cd112, PIR-B (gp49B), CD85J, CD85D, CD85A, CD85K, CD85C (LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8); ILT2, ILT4, ILT5, ILT3, SIRP-альфа, CD47, GARP, TGF-бета1, TDO, CD94, NKG2A, HLA-E, CSF1, CSF1R, 2B4 (CD244), CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2).

15

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую
 20 гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

25 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*; и

30 причем ICM представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3

(CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9, TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRIG), VISTA (B7-H5) и IDO.

5 В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

10 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

15 причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*; и

20 причем ICM представляет собой активатор или ингибитор иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2, в частности иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1 и PD-L1.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

25 (а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

30 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*; и

5 причем ICM представляет собой антагонист PD-1 или антагонист CTLA-4.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного

10

белка, функционально связана с промотором;

15

(b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой

20

штамм *Yersinia*; и

причем ICM представляет собой антагонистическое антитело против PD-1, антагонистическое антитело против PDL-1 и/или антагонистическое антитело против CTLA-4.

25 В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная

30

последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

(b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

где рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Yersinia enterocolitica*; и

причем ICM представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или

10 CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9 (галектина 9), TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектина-2 (CD112 или PVRL2), PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111), DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96), VISTA (B7-H5), IDO, OX40 (CD134), OX40L (CD252), CD137 (41BB), Cd137L (41BB-L),
 15 ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1), KIR, белков KIRDS (KIR2DSs и KIR3DSs), белков KIRDL (KIR2DLs и KIR3DLs), A2aR, CD27, CD70 (CD27L), BTLA, HVEM, GITR, GITRL, CD40, CD40L (CD154), TIM-1, CEACAM1, ICAM, LFA-1, CD2, CD160, HVEM, CD226, Cd112, PIR-B (gp49B), CD85J, CD85D, CD85A, CD85K, CD85C (LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8); ILT2, ILT4, ILT5, ILT3, SIRP-альфа, CD47, GARP, TGF-
 20 бета1, TDO, CD94, NKG2A, HLA-E, CSF1, CSF1R, 2B4 (CD244), CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

25 (a) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная
 30 последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

(b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

где рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Yersinia enterocolitica*; и

5 причем ИСМ представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), МНС-I, МНС-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9, TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRIG), VISTA (B7-H5) и IDO.

10

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

15

(б) модулятор иммунной контрольной точки (ИСМ); и, необязательно, (с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

где рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Yersinia enterocolitica*; и

20

причем ИСМ представляет собой активатор или ингибитор иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2, в частности иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1 и PD-L1.

30

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу

- полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- 5 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;
- 10 где рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Yersinia enterocolitica*; и
- причем ICM представляет собой антагонист PD-1 или антагонист CTLA-4.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

- 15 (a) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- 20 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;
- 25 где рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Yersinia enterocolitica*; и
- причем ICM представляет собой антагонистическое антитело против PD-1, антагонистическое антитело против PDL-1 и/или антагонистическое антитело против
- 30 CTLA-4.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация,

содержащая:

- (а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;
- причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Y. enterocolitica* MRS40 ДуорH,O,P,E,M,T; и
- причем ICM представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9 (галектина 9), TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRL2), PVRIG, PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111), DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96), VISTA (B7-H5), IDO, OX40 (CD134), OX40L (CD252), CD137 (41BB), Cd137L (41BB-L), ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1), KIR, белков KIRDS (KIR2DSs и KIR3DSs), белков KIRDL (KIR2DLs и KIR3DLs), A2aR, CD27, CD70 (CD27L), BTLA, HVEM, GITR, GITRL, CD40, CD40L (CD154), TIM-1, CEACAM1, ICAM, LFA-1, CD2, CD160, HVEM, CD226, Cd112, PIR-B (gp49B), CD85J, CD85D, CD85A, CD85K, CD85C (LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8); ILT2, ILT4, ILT5, ILT3, SIRP-альфа, CD47, GARP, TGF-бета1, TDO, CD94, NKG2A, HLA-E, CSF1, CSF1R, 2B4 (CD244), CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

- (а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую

гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного

5 белка, функционально связана с промотором;

(b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Y.*

10 *enterocolitica* MRS40 Δ*uopH,O,P,E,M,T*; и

причем ICM представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9, TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4

15 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRIG), VISTA (B7-H5) и IDO.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(a) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу

20 полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного

25 белка, функционально связана с промотором;

(b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой

30 *Yersinia enterocolitica* MRS40 Δ*uopH,O,P,E,M,T*; и

причем ICM представляет собой активатор или ингибитор иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2, в частности

иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1 и PD-L1.

5 В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

10 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

(с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

15 причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Y. enterocolitica* MRS40 *DyopH,O,P,E,M,T*; и

причем ICM представляет собой антагонист PD-1 или антагонист CTLA-4.

20 В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая:

(а) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

25 (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,

30 (с) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей;

причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой *Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T*; и

причем ICM представляет собой антагонистическое антитело против PD-1, антагонистическое антитело против PDL-1 и/или антагонистическое антитело против

5 CTLA-4.

Составы, способы введения и дозировки

Состав и способ введения можно адаптировать к отдельному субъекту, природе

состояния, подлежащего лечению у субъекта, и, как правило, решению лечащего врача.

10

Фармацевтическую комбинацию, т.е. фармацевтические композиции или комбинированные препараты в соответствии с настоящим изобретением, можно вводить в виде однократных или многократных доз с помощью любого из принятых способов введения агентов, обладающих аналогичными полезными свойствами,

15

включая ректальный, буккальный, интраназальный, трансмукозальный, трансдермальный, введение посредством внутриартериальной инъекции, посредством инфузии, внутривенно (инфузия или инъекция), внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, перорально и местно, включая внутриопухолевую инъекцию.

20

Фармацевтическая комбинация для применения в способе профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта, описанном в настоящем документе в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно подходит для инъекции, например внутривенной, внутримышечной, интратекальной, внутриопухолевой или

25

внутрибрюшинной инъекции, или инфузии, более предпочтительно подходит для внутривенной или внутриопухолевой инъекции или инфузии, и обычно содержит терапевтически эффективное количество действующих веществ и один или более подходящих фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей.

30

Таким образом, в предпочтительном варианте реализации фармацевтическую комбинацию вводят субъекту внутривенно или внутриопухолево, т.е. модулятор

иммунной контрольной точки и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят субъекту внутривенно или внутриопухолево, в частности путем внутривенной инфузии.

- 5 Способы введения модулятора иммунной контрольной точки субъекту можно выбрать из группы, состоящей из внутривенного, внутриопухолевого, подкожного, внутримышечного или внутрибрюшинного введения. Несмотря на то, что ограничение настоящего изобретения каким-либо конкретным способом применения не подразумевается, внутривенное или внутрибрюшинное введение модулятора иммунной
- 10 контрольной точки является предпочтительным.

Формы, в которых модулятор иммунной контрольной точки можно включать в композицию для введения путем инъекции или инфузии, включают водные или масляные суспензии или эмульсии с кунжутным маслом, кукурузным маслом,

15 хлопковым маслом или арахисовым маслом, а также эликсиры, растворы маннита, декстрозы, сахарозы или стерильный водный раствор и аналогичные фармацевтические среды-носители. Водные растворы в физиологическом растворе также можно применять обычным образом для инъекций или инфузий, предпочтительно в качестве водных растворов используют физиологически совместимые буферные среды,

20 например раствор Хэнка, раствор Рингера, L-гистидиновый буфер, цитрат натрия или буфер на основе физиологического раствора. Также можно использовать этанол, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль, (ледяную) уксусную кислоту, триамин пентауксусной кислоты и т.п. (и их подходящие смеси), производные циклодекстрина, полисорбат и растительные масла. Необходимую текучесть можно

25 поддерживать, например, с помощью покрытий, например лецитина, посредством сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсий, а также с помощью поверхностно-активных веществ. Растворы для инъекций готовят посредством включения соединения в соответствии с настоящим изобретением в требуемом количестве в соответствующий растворитель, при необходимости, с различными

30 другими компонентами, перечисленными выше. Как правило, дисперсии получают посредством включения различных стерилизованных действующих веществ в стерильную среду-носитель, содержащую основную дисперсионную среду и другие

требуемые компоненты из перечисленных выше. В случае порошков для получения растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, позволяющие получать действующее вещество в виде порошка в комбинации с любым дополнительным желательным компонентом. В то же время следует понимать, что количество фактически вводимого соединения обычно определяет врач в свете соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный путь введения, фактическое вводимое соединение и его относительную активность, возраст, массу тела и реакцию отдельного пациента, тяжесть симптомов у пациента и т.п.

10

Способы введения рекомбинантных грамотрицательных бактерий субъекту можно выбрать из группы, состоящей из внутривенного, внутриопухолевого, внутрибрюшинного и перорального введения. Несмотря на то, что ограничение настоящего изобретения каким-либо конкретным способом применения не подразумевается, внутривенное или внутриопухолевоe введение бактерий является предпочтительным.

15

Фармацевтические композиции или комбинированные препараты в отдельной форме, содержащие модулятор иммунной контрольной точки и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, можно получать с помощью обычных способов смешивания, растворения, гранулирования, изготовления таблеток с покрытием, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсуляции, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции или комбинированные препараты в отдельной форме можно получать обычным способом с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или добавок, облегчающих переработку действующего вещества в препараты, которые можно применять в фармацевтических целях. Правильный состав зависит от выбранного способа введения.

20

25

30

Содержание активных ингредиентов в отдельной дозе само по себе не обязательно представляет собой терапевтически эффективное количество, поскольку такое количество может достигаться путем введения множества единиц дозы. Композиция в

соответствии с настоящим изобретением может содержать, например, от приблизительно 10% до приблизительно 100% терапевтически эффективного количества действующих веществ.

- 5 Если фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением представляет собой комбинированный препарат, указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии предпочтительно не вводят в той же лекарственной форме, что и указанный модулятор иммунной контрольной точки.
- 10 Типовая схема лечения включает введение один раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки, через день, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц или один раз в 6 недель. Комбинацию в соответствии с настоящим изобретением обычно вводят несколько раз. Интервалы между разовыми дозами могут составлять, например, менее одного дня, ежедневно, через день, два раза
- 15 в неделю, еженедельно, два раза в неделю, один раз в три недели, один раз в месяц или один раз в 6 недель. Комбинацию в соответствии с настоящим изобретением можно применять в форме непрерывного лечения. Комбинацию в соответствии с настоящим изобретением также можно применять в виде схемы, при которой субъект получает циклы лечения, прерываемые "отдыхом от лекарств" или периодом отсутствия лечения.
- 20 Таким образом, комбинацию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в соответствии с выбранными вышеприведенными интервалами в течение непрерывного периода продолжительностью одну неделю или менее, в течение двух недель, в течение трех недель, в течение четырех недель, в течение пяти недель или в течение шести недель, а затем прекращать на одну неделю или менее, на две недели, на
- 25 три недели, на четыре недели, на пять недель или на шесть недель. Комбинация интервала лечения и интервала отсутствия лечения называется циклом. Цикл можно повторять один или более раз. Два или более различных циклов можно использовать в комбинации для повторения лечения один или более раз. Интервалы также могут быть нерегулярными, согласно показаниям на основании измерения уровней в крови (или
- 30 опухоли) указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии и/или указанного модулятора иммунной контрольной точки у пациента. В одном варианте реализации указанную фармацевтическую комбинацию в соответствии с настоящим

изобретением вводят один раз в сутки. В типовой схеме лечения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии можно вводить в количестве от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий в день, а модулятор иммунной контрольной точки можно вводить в количестве от 1 до 1000 мг в день.

5

Схемы введения рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, описанного в настоящем документе, зависят от конкретной поставленной цели, возраста и физического состояния субъекта, подвергаемого лечению, продолжительности лечения, природы сопутствующей терапии и конкретной применяемой бактерии, как известно специалисту. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии обычно вводят субъекту в соответствии с схемой приема, состоящей из разовой дозы каждые 1 - 20 дней, предпочтительно каждые 1 - 10 дней, более предпочтительно каждые 1 - 7 дней. Период введения обычно составляет от приблизительно 20 до приблизительно 60 дней, предпочтительно приблизительно 30 – 40 дней. В качестве альтернативы, период введения обычно составляет от приблизительно 8 до приблизительно 32 недель, предпочтительно от приблизительно 8 до приблизительно 24 недель, более предпочтительно от приблизительно 12 до приблизительно 16 недель.

10

15

В соответствии с настоящим изобретением также предложена фармацевтическая комбинация, содержащая рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, описанный в настоящем документе, необязательно содержащая подходящий фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель.

20

Рекомбинантные грамотрицательные бактерии могут входить в состав для удобного и эффективного введения в количестве, достаточном для лечения субъекта, в виде фармацевтической композиции с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Единичная лекарственная форма рекомбинантных грамотрицательных бактерий или фармацевтической композиции, подлежащей введению, например, человеку массой 70 кг, может, например, содержать рекомбинантные грамотрицательные бактерии в количестве от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий на лекарственную форму, предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 бактерий на лекарственную форму, более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^9 бактерий на лекарственную форму,

25

30

наиболее предпочтительно приблизительно 10^8 бактерий на лекарственную форму; или от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий на мл, предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 бактерий на мл, более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^9 бактерий на мл, наиболее предпочтительно от приблизительно 10^8 бактерий на мл.

Под терминами «количество, достаточное для лечения субъекта», или «эффективное количество», которые используют в настоящем документе взаимозаменяемо, подразумевают количество бактерии или бактерий, достаточно высокое для того, чтобы вызвать значительные положительные изменения состояния, подвергаемого лечению, но достаточно низкое для избегания серьезных побочных эффектов (при обоснованном соотношении польза/риск), в рамках обоснованного медицинского заключения. Эффективное количество бактерии зависит от конкретной поставленной цели, возраста и физического состояния субъекта, подвергаемого лечению, продолжительности лечения, природы сопутствующей терапии и конкретной применяемой бактерии. Эффективное количество бактерии, таким образом, представляет собой минимальное количество, обеспечивающее желательный эффект. Обычно субъекту вводят от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий, например, от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий/м² поверхности тела, предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 бактерий, например, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 бактерий/м² поверхности тела, более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/м² поверхности тела, наиболее предпочтительно 10^8 бактерий, например, 10^8 бактерий/м² поверхности тела.

Разовая доза рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии для введения субъекту, например человеку, для лечения рака, например злокачественной солидной опухоли, обычно составляет от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} бактерий, например от приблизительно 10^4 бактерий/м² поверхности тела до приблизительно 10^{10} бактерий/м² поверхности тела, предпочтительно от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий, например от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий/м² поверхности тела, более предпочтительно от приблизительно 10^6 до

приблизительно 10^8 бактерий, например от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий/ m^2 поверхности тела, еще более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/ m^2 поверхности тела, наиболее предпочтительно 10^8 бактерий, например 10^8 бактерий/ m^2 поверхности тела для всех рекомбинантных грамотрицательных бактерий.

Примеры веществ, которые могут выступать в качестве фармацевтических носителей, представляют собой углеводы, например лактозу, глюкозу и сахарозу; крахмал и его производные, например, кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, например карбоксиметилцеллюлозу натрия, этилцеллюлозу и ацетат целлюлозы; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; стеариновую кислоту; стеарат магния; сульфат кальция; карбонат кальция; растительные масла, например арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао-бобов; многоатомные спирты, например пропиленгликоль, глицерин, сорбит, полисорбат, маннит и полиэтиленгликоль; агар; альгиновые кислоты; апирогенную воду; изотонический раствор хлорида натрия; экстракты клюквы и фосфатный буферный раствор; обезжиренное сухое молоко; а также другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах, например витамин С, эстроген и эхинацею. Кроме того, в композиции могут присутствовать увлажнители и смазывающие вещества, например, лаурилсульфат натрия, а также красители, ароматизирующие вещества, смазывающие вещества, вспомогательные вещества, вещества, способствующие формированию таблеток, стабилизаторы, антиоксиданты и консерванты.

Разовая доза модулятора иммунной контрольной точки включает дозировку в диапазоне от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг массы тела, предпочтительно от 1 до 20 мг/кг массы тела, причем типичная масса тела человека составляет 70 кг.

В зависимости от пути введения может требоваться покрытие действующих веществ, содержащих бактерии, материалом для защиты указанных организмов от действия ферментов, кислот и других природных условий, которые могут инактивировать указанные организмы. С целью введения бактерий путем, отличным от

- парентерального введения, бактерии следует покрывать материалом для защиты от инактивации или вводить вместе с указанным материалом. Например, бактерии можно вводить совместно с ингибиторами ферментов или в липосомах. Ингибиторы ферментов включают ингибитор трипсина поджелудочной железы,
- 5 диизопропилфторфосфат (DFP) и трасилол. Липосомы включают эмульсии P40 типа "вода в масле в воде", а также общепринятые и специально разработанные липосомы, которые переносят бактерии, например *Lactobacillus*, или их побочные продукты, к внутренней мишени субъекта-хозяина.
- 10 Одну бактерию можно ввести саму по себе или в комбинации со второй, отличной бактерией. Любое количество различных бактерий можно применять в сочетании друг с другом. Под термином «в сочетании с» подразумевают «вместе», по существу одновременно или последовательно. Композиции можно также вводить в форме таблетки, пилюли или капсулы, например, например, лиофилизированной капсулы,
- 15 содержащей бактерии в соответствии с настоящим изобретением, или в виде замороженного раствора бактерий в соответствии с настоящим изобретением, содержащего ДМСО или глицерин. Другая предпочтительная форма применения включает получение лиофилизированной капсулы бактерий в соответствии с настоящим изобретением. Еще одна предпочтительная форма применения включает
- 20 получение термически высушенной капсулы бактерий в соответствии с настоящим изобретением. Композицию можно составлять в виде лиофилизата, который растворяют в подходящем буфере перед введением в виде жидкой формы (суспензии или раствора).
- 25 Рекомбинантные грамотрицательные бактерии, подлежащие введению, можно вводить путем инъекции. Формы, подходящие для применения путем инъекции, включают моносеptические суспензии и моносеptические порошки для немедленного получения моносеptической суспензии для инъекций. Во всех случаях форма должна быть моносеptической и жидкой в той степени, чтобы ее можно было с легкостью ввести с
- 30 помощью шприца. Форма должна быть стабильной в условиях производства и хранения. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, углеводы, многоатомный спирт (например, глицерин,

пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие смеси таких компонентов и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, например лецитина, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии. Во многих случаях
5 предпочтительно включать в композицию изотонические вещества или физиологически совместимые буферы, например углеводы, хлорид натрия или L-гистидиновый буфер. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций можно обеспечить посредством применения в указанных композициях веществ, задерживающих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

10

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамтрицательной бактерии вводят субъекту совместно с сидерофором. Данные варианты реализации являются предпочтительными. Сидерофоры, которые можно вводить совместно, представляют собой сидерофоры, включающие гидроксамат,
15 катехолат и сидерофоры со смешанными лигандами. Предпочтительные сидерофоры представляют собой дефероксамин (также известный как десферриоксамин В, десфероксамин В, DFO-B, DFOA, DFB или десферал), десферриоксамин Е, деферазирокс (эксиджад, десирокс, дефриджет, десифер) и деферипрон (феррипрокс), причем более предпочтительным является дефероксамин. Дефероксамин представляет
20 собой бактериальный сидерофор, продуцируемый актинобактерией *Streptomyces pilosus*, который доступен для приобретения, например, у компании Novartis Pharma Schweiz AG (Швейцария).

Совместное введение с сидерофором можно выполнять до, одновременно или после
25 введения рекомбинантного штамма грамтрицательной бактерии. Сидерофор предпочтительно вводят до введения рекомбинантного штамма грамтрицательной бактерии, более предпочтительно вводят приблизительно за 24 часа до, предпочтительно приблизительно за 6 часов до, более предпочтительно за 3 часа до, в частности, за 1 час до введения субъекту рекомбинантного штамма грамтрицательной
30 бактерии. В конкретном варианте реализации субъект получает предварительное лечение десфероксамином за 1 час до инфицирования рекомбинантным штаммом грамтрицательной бактерии в целях обеспечения роста бактерий. Обычно сидерофор

вводят совместно в разовой дозе от приблизительно $0,5 \times 10^{-5}$ моль до приблизительно 1×10^{-3} моль, более предпочтительно от приблизительно 1×10^{-5} моль до приблизительно 5×10^{-4} моль, предпочтительно от приблизительно 1×10^{-4} моль до приблизительно 4×10^{-4} моль. Обычно десфероксамин вводят совместно в разовой дозе от приблизительно 20 мг до приблизительно 500 мг, предпочтительно от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг на субъекта, более предпочтительно совместно вводят разовую дозу 100 мг дерсфериоксиамина.

В одном варианте реализации раковые клетки, например клетки злокачественной солидной опухоли, приводят в контакт с двумя рекомбинантными штаммами грамотрицательных бактерий, причем первый рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии экспрессирует первый гибридный белок, содержащий сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и первый гетерологичный белок, а второй рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии экспрессирует второй гибридный белок, содержащий сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и второй гетерологичный белок, так что первый и второй гибридные белки транслоцируются в клетку злокачественной солидной опухоли или клетку микроокружения опухоли. В этом варианте реализации предложен способ совместного инфицирования клетки рака, например клетки злокачественной солидной опухоли, двумя штаммами бактерий в качестве эффективного способа доставки, например, двух различных гибридных белков в одну клетку.

Применение комбинаций в соответствии с настоящим изобретением для лечения рака

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, для применения в способе профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта.

Кроме того, предложено применение фармацевтической комбинации, описанной в настоящем документе, для получения лекарственного средства для профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта.

- 5 Кроме того, предложено применение фармацевтической комбинации, описанной в настоящем документе, для профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта.

- 10 Кроме того, предложен способ профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической комбинации, описанной в настоящем документе.

- 15 В настоящем документе термины «лечение»/«обработка» включают: (1) задержку появления клинических симптомов состояния, расстройства или патологии, развивающихся у животного, в частности, млекопитающего и, в особенности, человека, которое может страдать от указанного состояния, расстройства или патологии, или быть предрасположено к ним, однако еще не испытывает или не проявляет клинических или субклинических симптомов указанного состояния, расстройства или
- 20 патологии; (2) ингибирование состояния, расстройства или патологии (например, остановка, снижение или задержка развития заболевания или его рецидива в случае поддерживающего лечения по меньшей мере одного его клинического или субклинического симптома); и/или (3) облегчение состояния (т.е. вызывание регрессии
- 25 состояния, расстройства или патологии или по меньшей мере одного из их клинических или субклинических симптомов). Благоприятный эффект для пациента, подлежащего лечению, является статистически значимым или по меньшей мере ощутимым для пациента или врача. Однако следует понимать, что при введении лекарственного средства пациенту для лечения заболевания результат не всегда может являться
- 30 эффективным лечением.

В настоящем документе «задержка прогрессирования» означает увеличение времени до появления симптома рака или характерного признака, ассоциированного с раком, или

замедление увеличения тяжести симптома рака. Кроме того, «задержка прогрессирования» в настоящем документе включает регрессию или подавление прогрессирования заболевания. "Подавление" прогрессирования заболевания или осложнения заболевания у субъекта означает предотвращение или снижение прогрессирования заболевания и/или осложнения заболевания у субъекта.

Предохранительное лечение включает профилактическое лечение. При профилактическом применении фармацевтическую комбинацию в соответствии с настоящим изобретением вводят субъекту с подозрением на наличие рака или с риском его развития. При терапевтическом применении фармацевтическую комбинацию вводят субъекту, например пациенту, уже страдающему от рака, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного подавления симптомов заболевания. Количества, эффективные для такого применения, зависят от тяжести и течения заболевания, предшествующей терапии, состояния здоровья субъекта и реакции на лекарственные средства, а также от заключения лечащего врача.

Если состояние субъекта не улучшается, фармацевтическую комбинацию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить хронически, т.е. в течение длительного периода времени, в том числе на протяжении всей жизни субъекта, с целью улучшения или иного контроля или ограничения симптомов заболевания или состояния субъекта.

Если статус субъекта улучшается, фармацевтическую комбинацию можно вводить непрерывно; в альтернативном варианте, дозу вводимых лекарственных средств можно временно уменьшить или временно приостановить их прием на определенное время (т.е. «отдых от лекарств»). После улучшения состояния пациента при необходимости вводят поддерживающую дозу фармацевтической комбинации в соответствии с настоящим изобретением. Впоследствии дозировку и/или частоту введения необязательно снижают в зависимости от симптомов до уровня, при котором сохраняется улучшение состояния при заболевании.

В одном варианте реализации рак выбран из группы, состоящей из саркомы, лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, злокачественных заболеваний центральной нервной системы и злокачественных солидных опухолей, которые включают, без

ограничения, патологическое скопление клеток, которые могут происходить из тканей различных типов, например печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишки, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичка, щитовидной железы или легкого и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишок, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичек, щитовидной железы или легкого. Рак предпочтительно представляет собой солидную опухоль, предпочтительно злокачественную солидную опухоль. Более предпочтительно рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, меланомы и рака толстой кишки (карциномы толстой кишки).

В одном варианте реализации солидная опухоль представляет собой злокачественную солидную опухоль у субъекта, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии накапливается в злокачественной солидной опухоли. Таким образом, в одном варианте реализации солидная опухоль представляет собой злокачественную солидную опухоль у субъекта, причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии накапливается в указанной злокачественной солидной опухоли, причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии вводят в количестве, достаточном для лечения субъекта.

Гетерологичные белки штамма грамотрицательной бактерии можно доставить, т.е. транслоцировать в раковую клетку, например в клетки злокачественной солидной опухоли во время введения рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии субъекту, или их можно доставить, т.е. транслоцировать в раковую клетку, например в клетки злокачественной солидной опухоли или в клетки микроокружения опухоли позже, например после достижения рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии раковых клеток, например области злокачественной солидной опухоли, и/или

достижения им раковых клеток, например области злокачественной солидной опухоли, и его репликации, как описано выше. Время доставки можно регулировать, например, с помощью промотора, который применяют для экспрессии гетерологичных белков в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии. В первом случае экспрессию гетерологичного белка может запускать конститутивный промотор или, более предпочтительно, эндогенный промотор бактериального эффекторного белка. В случае отсроченной доставки белка экспрессию гетерологичного белка может запускать искусственно индуцируемый промотор, например промотор, индуцируемый арабинозой. В данном случае, после достижения бактериями желательной области и их накопления в ней субъекту введут арабинозу (или индуктор соответствующего индуцибельного промотора). Затем арабиноза индуцирует бактериальную экспрессию белка, подлежащего доставке.

В одном варианте реализации способ лечения рака включает:

- i) культивирование рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, описанного в настоящем документе;
- ii) введение субъекту указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, указанного в i), причем гибридный белок, содержащий сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируется рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии и транслоцируется в раковую клетку или клетку микроокружения опухоли; и, необязательно
- iii) расщепление гибридного белка, так что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка внутри раковой клетки, причем рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии вводят в количестве, достаточном для лечения субъекта.

Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии и ИСМ можно вводить одновременно или последовательно в любом порядке. Следовательно, рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии можно вводить, например, до, одновременно или после ИСМ или наоборот. Предшествующее введение в настоящем документе относится к предшествующему началу лечения одним соединением (например, ИСМ) до начала лечения другим соединением (например, штаммом грамотрицательной бактерии).

Последующее введение в настоящем документе относится к последующему началу лечения одним соединением (например, ICM) после начала лечения другим соединением (например, штаммом грамотрицательной бактерии). Одновременное введение в настоящем документе относится к одновременному началу лечения обоими соединениями (ICM и штаммом грамотрицательной бактерии), т.е. в один и тот же день введения.

Составной набор

В соответствии с настоящим изобретением также предложен набор для лечения рака, например злокачественных солидных опухолей, предпочтительно у человека. Такие наборы, как правило, содержат фармацевтическую комбинацию, описанную в настоящем документе, и инструкции по применению набора. В некоторых вариантах реализации наборы содержат носитель, упаковку или контейнер, разделенный на отсеки для размещения одного или более контейнеров, например, флаконов, пробирок и т.п., причем каждый контейнер содержит один из отдельных элементов для применения в способе, описанном в настоящем документе. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. В других вариантах реализации контейнеры изготовлены из различных материалов, например, стекла или пластмассы. В дополнительном варианте реализации набор содержит упакованные контейнеры, содержащие лекарственные средства, указанные выше.

Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложен составной набор, содержащий первый контейнер, второй контейнер и вкладыш в упаковку, причем первый контейнер содержит по меньшей мере одну дозу лекарственного средства, содержащего рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, при этом второй контейнер содержит по меньшей мере одну дозу

лекарственного средства, содержащего ингибитор иммунной контрольной точки (ИСТ), а вкладыш в упаковку обязательно содержит инструкции по лечению субъекта от рака с применением указанных лекарственных средств.

Примеры

Настоящие примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают его.

5

Пример 1:

А) Материалы и способы

Штаммы бактерий и условия роста. Штаммы, использованные в этом исследовании, перечислены на фиг. 43. *E. coli* Top10 (от Invitrogen), который применяли для очистки и клонирования плазмиды, и *E. coli* Sm10 λ pir (Simon et al., 1983), который применяли для конъюгации, а также *E. coli* BW19610 (Metcalf et al., 1994), который применяли для размножения рKNG101, выращивали общепринятым способом на чашках с агаром LB и в бульоне LB при температуре 37 °С. Ампициллин использовали в концентрации 200 мкг/мл (*Yersinia*) или 100 мкг/мл (*E. coli*). Стрептомицин использовали в концентрации 100 мкг/мл для селекции векторов-«самоубийц». Хлорамфеникол использовали в концентрации 10 мкг/мл. *Y. enterocolitica* MRS40 (O:9, биотип 2) (Sarker et al., 1998) представляет собой чувствительное к ампициллину производное *Y. enterocolitica* E40 (Sory and Cornelis, 1994). Все штаммы *Y. enterocolitica* выращивали на сердечно-мозговом экстракте (BHI; Difco) при комнатной температуре. Ко всем штаммам *Y. enterocolitica* добавляли налидиксовую кислоту (35 мкг/мл). Как *Y. enterocolitica* MRS40, так и E40 содержали идентичную плазмиду рYV под названием рYV-MRS40 или рYV-E40 (плазмиду вирулентности штаммов *Y. enterocolitica* MRS40 и E40), которая показана на фигуре 1. Полная последовательность близкородственной плазмиды рYV *Y. enterocolitica* W22703, рYVe227 доступна в Genbank (AF102990.1). Плазмида рYV, полученная из рYV-MRS40 путем разрушения всех эффекторных белков T3SS (yopH, yopO, yopP, yopE, yopM, yopT), обозначена как рYV-Y004, а соответствующие штаммы *Y. enterocolitica* MRS40, несущие рYV-Y004, обозначены как *Y. enterocolitica* MRS40 Δ НОРЕМТ, как показано, например, на фиг. 43. рYV-Y004 описана и изображена на фигуре 2. Инсерция доменов Rig-I CARD2 человека в качестве гибрида с yopE₁₋₁₃₈ в области расположения нативного yopE на рYV-Y004 приводила к получению рYV-Y021, а дополнительная инсерция YopE₁₋₁₃₈ (после адаптации кодонов) в качестве гибрида с cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека в месте расположения yopH на рYV021 приводила к получению рYV-Y051. рYV-Y051 описана и изображена на фигуре 3.

Генетические манипуляции с *Y. enterocolitica*. Описаны генетические манипуляции с *Y. enterocolitica* (Diepold et al., 2010; Iriarte et al., 1995). Вкратце, мутаторы для модификации или делеции генов в плазидах рYV или на хромосоме конструировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами из 2 фрагментов с применением очищенной плазмиды рYV40 или геномной ДНК в качестве матрицы, что приводило к получению фланкирующих последовательностей размером 200 – 250 п.о. на обеих сторонах делетированного или модифицированного фрагмента соответствующего гена. В качестве альтернативы использовали полностью синтетические фрагменты ДНК (синтезированные de-novo) с фланкирующими последовательностями размером 200 - 250 п.о. на обеих сторонах делетированного или модифицированного фрагмента соответствующего гена. Полученные в результате фрагменты клонировали в рKNG101 (Kaniga et al., 1991) в *E. coli* BW19610 (Metcalf et al., 1994). Плазидами с подтвержденной последовательностью трансформировали *E. coli* Sm10 λ pir, из которого выполняли мобилизацию плазмид в соответствующий штамм *Y. enterocolitica*. Мутанты, несущие встроенный вектор, размножали в течение нескольких поколений без селекционного давления. Затем для селекции клонов, утративших вектор, использовали сахарозу. Наконец, мутанты идентифицировали с помощью ПЦР для отбора колоний. Конкретные мутаторы (рТЗР-456 и рТЗР-714) перечислены в таблице III.

Конструирование плазмид. Плазмиду рBad_Si_2 и рТЗТ-715 применяли для клонирования гибридных белков с N-концевыми 138 аминокислотами YopE (SEQ ID NO: 25). рBad_Si_2 (фигура 4) конструировали путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE, из очищенной рYV40 в сайт KpnI/HindIII рBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включали удаление фрагмента NcoI/BglII рBad-MycHisA путем гидролиза, обработку фрагментом Кленова и повторное лигирование. Дополнительно на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ добавляли следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI-HindIII (создание MCS, см. SEQ ID NO: 36). Она несла сайт инициации репликации рBR322 (SEQ ID NO: 29). Векторы рТЗР-454 (фигура 5) и рТЗР-453 (фигура 6) получали из рBAD_SI_2 путем клонирования доменов Rig1-CARD2 мыши или человека (соответственно) с

использованием рестрикции/лигирования в сайтах XbaI/HindIII в той же рамке считывания, что и ОРС YopE 1-138, как описано ниже.

рТЗР-715 (фигура 7) представляет собой полностью синтетическую плазмиду (вектор, синтезированный de-novo) с характеристиками, сходными с pBAD_Si_2, причем соответствующую кодирующую область AgaC делетировали, а ген устойчивости к ампициллину (плюс 70 п.о. до него) заменили геном устойчивости к хлорамфениколу с областью 200 п.о. до него. Для ясности, рТЗР-715 содержала фрагмент SycE-YopE1-138, содержащий эндогенные промоторы для YopE и SycE из pYV40, причем на 3'-конце YopE1-138 добавили следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI-HindIII. Она содержала сайт инициации репликации pBR322 и хлорамфениколацетилтрансферазу (cat) из мобильного генетического элемента Tn9 (Alton and Varnek, 1979). pBad_Si_2 и рТЗР-715 представляли собой среднекопийные плазмиды с сайтом инициации репликации pBR322 (pMB1) (SEQ ID NO: 29).

Вектор рТЗР-751 (фигура 8) получили из рТЗР-715 путем клонирования, в виде одного оперона, YopE1-138 в качестве гибрида с доменами Rig1-CARD2 человека, за которым следовал YopE1-138 (после адаптации кодонов) в качестве гибрида с cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека с использованием рестрикции/лигирования в сайтах XbaI/HindIII, как описано ниже.

Гетерологичные белки для доставки – RIG-I. RIG-I (также называемый DDX58; Uniprot Q6Q899 для белка мыши и Uniprot O95786 для белка человека) представляет собой цитоплазматический сенсор короткой двухцепочечной РНК и основной рецептор распознавания структур врожденной иммунной системы. RIG-I состоит из домена РНК-хеликазы, С-концевого домена и N-концевого домена, состоящего из двух доменов CARD (Brisse and Ly, 2019). Выбранный гетерологичный белок для доставки в основном состоял только из N-концевых доменов CARD RIG-I (без остальной части белка; RIG-I₁₋₂₄₅ человека; RIG-I₁₋₂₄₆ мыши), что приводило к РНК-независимой конститутивной активации пути RIG-I. Доставляемые бактериями домены CARD RIG-I были доступны и приводили к активации MAVS и TBK1. После этого происходила транслокация активированных IRF3 и IRF7 в ядро, что приводило к транскрипции ISRE-регулируемых кодирующих последовательностей, например, ИФН-а и -b.

Аналогичным образом, домен CARD или домены CARD из MAVS или MDA5 выбрали с целью обеспечения их функционирования независимо от агониста при доставке бактериями.

Гетерологичные белки для доставки – cGAS. Синтаза циклического ГМФ-АМФ (cGAS; Uniprot Q8N884 для белка человека) представляет собой цитоплазматический сенсор ДНК. cGAS представляет собой нуклеотидилтрансферазу, катализирующую образование циклического ГМФ-АМФ (цГАМФ) из АТФ и гуанозинтрифосфата (ГТФ) и являющуюся частью сигнального пути обнаружения ДНК cGAS-STING. Она содержит два основных сайта связывания дцДНК на противоположных сторонах каталитического кармана и активируется при связывании с цитозольной ДНК. После связывания с ДНК cGAS катализирует синтез цГАМФ, который затем функционирует как вторичный мессенджер, связывающийся с трансмембранным белком 173 (TMEM173)/STING, расположенным в эндоплазматическом ретикулуме, и активирующий его. Затем STING активирует киназу протеинкиназы IкВ (ИКК) и ТВК1, которые, в свою очередь, активируют факторы транскрипции NF-кВ и IRF3 для индукции интерферонов и других цитокинов. Вторичный мессенджер цГАМФ может также переходить в другие клетки несколькими способами и, посредством этого, передавать сигнал опасности цитозольной ДНК окружающим клеткам. У укороченного с N-конца cGAS (например, cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека) нет N-концевого ДНК-связывающего домена, однако сохраняется ферментативная активность. Доставка этого укороченного cGAS в эукариотические клетки приводила к внутриклеточной продукции цГАМФ вследствие ферментативной активности cGAS, что приводило к активации пути STING. Как видно для пути RIG-I, активация пути STING в конечном итоге приводила к продукции ИФН I типа.

Гены мыши и человека синтезировали de novo, что позволило адаптировать использование кодонов к *Y. enterocolitica* (фиг. 43) и клонировать их в качестве гибридов с YopE₁₋₁₃₈ в плазмиды pBad_Si_2 или pT3P-715, обе из которых представляли собой среднекопийные векторы (см. ниже таблицу II). Лигированные плазмиды клонировали в *E. coli* Top10. Секвенированные плазмиды переносили посредством электропорации в желательный штамм *Y. enterocolitica* с использованием настроек для стандартной электропорации для *E. coli*.

Таблица I (праймер № ТЗР_: Последовательность)

SEQ ID NO: 32: Праймер №: prT3T_887
 cacatgtggtcgacGAATAGACAGCGAAAGTTGTTGAAATAATTG

5

SEQ ID NO: 33: Праймер №: prT3T_955
 cactacccccctgttttatccataTTAATTGCGCGGTTTAAACGGG

10

SEQ ID NO: 34: Праймер №: prT3T_956
 TATGGATAAAAACAAGGGGGTAGTG

SEQ ID NO:35: Праймер №: prT3T_888
 catcggaatgggccGTTTTTCAGTATAAAAAGCACGGTATATAC

15

Таблица II: Клонированные гибридные белки

Белок, подлежащий доставке с помощью ТЗSS	SEQ ID NO: белка	Остов плазмиды	Название полученной плазмиды	Праймеры . ТЗТ_№:	SEQ ID NO: праймера
YopE _{1-138-<i>enterocolitica</i>} кодон-оптимизированным RIG-1 CARD ₂ человека (AK 1-245)	Y. c 1	pBad_Si_2	pT3P-453	синтетический конструктор	/
YopE _{1-138-<i>enterocolitica</i>} кодон-оптимизированным RIG-1 CARD ₂ мыши (AK 1-246)	Y. c 4	pBad_Si_2	pT3P-454	синтетический конструктор	/
YopE _{1-138-<i>enterocolitica</i>} кодон-оптимизированным RIG-1 CARD ₂ человека (AK 1-245) и YopE ₁₋₁₃₈ (после адаптации кодонов)- <i>Y. enterocolitica</i> с кодон-оптимизированным cGAS человека (AK 161-522)	Y. c 1 и 10	pT3P-715	pT3P-751	синтетический конструктор	/

Таблица III: Мутаторы для генетической модификации и полученные плазмиды pYV

Мутатор /конструктор	Подлежит инсерции в:	Остов плазмиды	Название полученного мутатора	Название полученной pYV	Праймеры, pгТЗТ_ No. :	Праймеры, SEQ ID NO:	Матрица	использовались с исходным штаммом
YopE ₁₋₁₃₈ -Y. <i>enterocolitica</i> с кодон-оптимизированным RIG-1 CARD ₂ человека (AK 1-245)	pYV (yopE ::)	pKN G101	pТЗР_456	pYV-021	ПЦР1: 887/955 ПЦР2: 956/888 ПЦР с перекрывающимися праймерами 887/888	32/33, 34/35, 32/35	ПЦР1: pТЗР-453 ПЦР2: Y. <i>enterocolitica</i>	Y. <i>enterocolitica</i> ΔyopH OPEM T pYV-Y004
YopE ₁₋₁₃₈ -Y. <i>enterocolitica</i> с кодон-оптимизированным RIG-1 CARD ₂ человека (AK 1-245) И YopE ₁₋₁₃₈ - Y. <i>enterocoli</i>	pYV (yopE:: и yopH::)	pKN G101	pТЗР_714	pYV-051	/ (синтетический ген)	/	/	Y. <i>enterocolitica</i> ΔyopH OPEM T pYV-021

<i>tica</i> с кодон- оптимизи- рованны м cGAS человека (AK 161- 522)								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

Бактериальный препарат для в/о / в/в инъекций животным

Замороженный базовый раствор *Y. enterocolitica* (7% базового раствора бактерий, выращенных до ОП₆₀₀= 8 и хранившихся при -80°C, с ДМСО) разбавляли свежим ВНИ с добавлением соответствующих антибиотиков до ОП₆₀₀, равной 0,1, и выращивали в течение 2/3 ч при к.т., а затем повышали температуру до 37 °С на качалке с водяной баней в течение еще 2 ч. Наконец, бактерии собирали путем центрифугирования (6000 ед. относительного центробежного ускорения, 30 сек), дважды промывали PBS (стерильным, не содержащим эндотоксинов) и ресуспендировали в стерильном PBS.

5

10 Концентрацию бактериальной суспензии доводили до требуемого значения на основе ОП₆₀₀, и вводили суспензию мышам согласно показаниям, приведенным ниже. Эффективность инокулята, вводимого мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения.

15 Эффективность на моделях аллотрансплантата опухоли ЕМТ-6 на мышах и при в/о / в/в обработке

Содержание животных и экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством Национального исследовательского совета по уходу за лабораторными животными и их использованию. Все процедуры с использованием животных (включая хирургическое вмешательство, анестезию и эвтаназию, в соответствующих случаях) были одобрены французскими органами (CNREEA). Мышей BALB/cByJ (модель ЕМТ-6) в возрасте 5 - 7 недель заказывали в компании Charles Rivers и содержали в окружении, свободном от специфической патогенной микрофлоры (SPF). После по меньшей мере 5-14 дней

20

адаптации мышей анестезировали изофлураном, и выполняли подкожную аллотрансплантацию 200 мкл клеток ЕМТ-6 (1×10^6 клеток) в бок мышцы. В течение всего эксперимента оценивали поведение и внешний вид мышей, а также измеряли их массу тела.

5

После достижения объема опухолей 60-130 мм³ (средний размер 92 +/- 19 мм³) мышей рандомизировали в группы и вводили антитело против PD-1 (клон: RMP1-14, № в каталоге: BE0146, изотип: IgG2a крысы, Bioxcell), разбавленное PBS до концентрации 1 мг/мл (10 мг/кг), путем в/б инъекции. В качестве контроля мышам вводили только стерильный PBS, не содержащий эндотоксинов. В тот же день мышей инфицировали *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши ($7,5 \times 10^7$ бактерий) путем инъекции непосредственно в опухоль (в/о). Эффективность инокулята, вводимого мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам вводили только стерильный PBS, не содержащий эндотоксинов. День первой обработки задавали как день 0. Далее обработку повторяли, как описано выше: в/о введение *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, или контрольного PBS выполняли в дни 0, 1, 5, 6, 10, 11; а в/б введение антитела против PD-1 (клон: RPM1-14, изотип: IgG2a крысы, Bioxcell, 10 мг/кг на инъекцию) или контрольного PBS выполняли в дни 0, 4, 7, 11. За 24 часа до последней обработки бактериями мышам вводили раствор десферала в дозе 8 мг/мл (10 мг/кг) путем в/б инъекции. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью штангенциркуля. Объем опухоли определяли как $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширину}^2$. Объем опухоли, превышающий 1500 мм³, задавали как гуманный конечный показатель. В соответствующие дни после инфекции мышей умерщвляли посредством передозировки при газовой анестезии (изофлураном) с последующим смещением шейных позвонков или обескровливанием.

Для повторного анализа в дбб 1×10^6 клеток ЕМТ6 вводили путем подкожной инъекции в 200 мкл RPMI 1640 в противоположный бок всех выживших мышей, у которых первые опухоли ЕМТ6 были необнаружимыми (0 мм³), либо их размер составлял менее 25 мм. Аналогичную трансплантацию выполняли десяти наивным мышам, используя их в качестве контроля роста опухоли. Прогрессирование опухоли отслеживали, как описано выше.

30

Эффективность на моделях аллотрансплантата опухоли В16F10 на мышах при в/о / в/б обработке.

Содержание животных и экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством NRC по уходу за лабораторными животными и их использованию. Все процедуры с использованием животных были согласованы с французскими органами (CNREEA). Мышей C57BL/6J (модель В16F10) в возрасте 7 недель заказывали в компании Janvier Labs и содержали в окружении, свободном от специфической патогенной микрофлоры (SPF). После меньшей мере 5-14 дней адаптации мышей анестезировали изофлураном, и выполняли подкожную аллотрансплантацию 200 мкл клеток В16F10 (1×10^6 клеток) в бок мышцы. В течение всего эксперимента оценивали поведение и внешний вид мышей, а также измеряли их массу тела.

15 После достижения объема опухолей 30-120 мм³ (средний размер 71 +/- 25 мм³) мышей рандомизировали в группы и вводили антитело против PD-1 (клон: RMP1-14, № в каталоге: BE0146, изотип: IgG2a крысы, Bioxcell) или антитело против CTLA-4 (клон: 9H10, № в каталоге: BE0131, изотип: IgG1 хомяка, Bioxcell), разбавленное PBS до концентрации 1 мг/мл (10 мг/кг), путем в/б инъекции. В качестве контроля мышам вводили только стерильный PBS, не содержащий эндотоксинов. В тот же день мышей инфицировали *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши ($7,5 \times 10^7$ бактерий) путем инъекции непосредственно в опухоль (в/о). Эффективность инокулята, вводимого мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам вводили только стерильный PBS, не содержащий эндотоксинов. День первой обработки задавали как день 0. Далее обработку повторяли, как описано выше: в/о введение *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, или контрольного PBS выполняли в дни 0, 1, 2, 3, 6, 9; а в/б введение антитела против PD-1 или антитела против CTLA-4 или контрольного PBS выполняли в дни 0, 4, 7, 11. За 24 часа до последней обработки бактериями мышам вводили 8 мг/мл (10 мг/кг) раствор десферала путем в/б инъекции. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью штангенциркуля. Объем опухоли определяли как $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширину}^2$. Объем

опухоли, превышающий 1500 мм³, задавали как гуманный конечный показатель. В соответствующие дни после инфекции мышей умерщвляли посредством передозировки при газовой анестезии (изофлураном) с последующим смещением шейных позвонков или обескровливанием.

5

Эффективность на моделях аллотрансплантата опухоли B16F10 на мышах при в/о / в/б обработке

Все эксперименты на животных, описанные в настоящем исследовании, были рассмотрены и одобрены

- 10 местным этическим комитетом (CELEAG, местный этический комитет Женевы по работе с лабораторными животными). Мышей C57BL/6J (модель B16F10) в возрасте 8 недель заказывали в компании Charles Rivers Labs. После по меньшей мере пяти дней адаптации мышей анестезировали изофлураном, и выполняли подкожную аллотрансплантацию 100 мкл клеток B16F10 (5×10^5 клеток) в бок мыши. В течение
- 15 всего эксперимента оценивали поведение и внешний вид мышей, а также измеряли их массу тела.

- После достижения объема опухолей 40-120 мм³ (средний размер 66 ± 22 мм³) мышей рандомизировали в группы и вводили раствор десферала (10 мг/кг) путем в/б инъекции;
- 20 эта дата соответствовала дню 0. В тот же день мышей инфицировали *Y. enterocolitica* ДНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (1×10^7 бактерий) путем инъекции в хвостовую вену в дни 0, 2, 4, 6, 9, 13, 16, 20. Эффективность инокулята, вводимого мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам вводили только стерильный PBS, не содержащий эндотоксинов.
- 25 Антитело против PD-1 или изотипическое контрольное антитело вводили в/б в дозе 10 мг/кг в дни 0, 4, 6 и 9. Кроме того, все мыши получали в/б инъекцию десферала в дозе 10 мг/кг в дни 6, 13, 20. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью ручного штангенциркуля. Объем опухоли определяли как $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$. Объем опухоли, превышающий 1500 мм³,
- 30 задавали как гуманный конечный показатель. В соответствующие дни после инфекции мышей умерщвляли.

Эффективность на моделях аллотрансплантата опухоли СТ26 на мышах при в/о / в/б обработке.

Содержание животных и экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством Национального исследовательского совета по уходу за лабораторными животными и их использованию. Все процедуры с использованием животных (включая хирургическое вмешательство, анестезию и эвтаназию, в соответствующих случаях) были одобрены французскими органами (CNREEA). Мышей BALB/c (BALB/cByJ) в возрасте 5 - 6 недель заказывали в компании Charles Rivers и содержали в окружении, свободном от специфической патогенной микрофлоры (SPF). После по меньшей мере 5-14 дней адаптации мышей анестезировали изофлураном, и выполняли подкожную аллотрансплантацию 200 мкл клеток СТ26 (1×10^6 клеток) в бок мыши. В течение всего эксперимента оценивали поведение и внешний вид мышей, а также измеряли их массу тела.

15 После достижения объема опухолей 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³) мышей рандомизировали в группы и вводили антитело против PD-1 (учетный номер: BE0146, Bioxcell; клон: RMP1-14, изотип: IgG2a крысы) или соответствующий контроль: антитело крысы изотипа IgG2a (учетный номер: BE0089, Bioxcell; клон: 2A3); и/или антитело против PD-L1 (учетный номер: BP0101, BioXcell; клон: 10F.0G2; изотип: IgG2b крысы) или соответствующий контроль: антитело крысы изотипа IgG2b (учетный номер: BE0090, Bioxcell; клон: LTF-2) в дозе 10 мг/кг путем в/б инъекции. В тот же день по меньшей мере через четыре часа мышей инфицировали *Y. enterocolitica* ДНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека ($7,5 \times 10^7$ бактерий) путем внутриопухолевой (в/о) инъекции. Эффективность инокулята, вводимого мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам вводили только стерильный PBS, не содержащий эндотоксинов. День первой обработки задавали как день 0. Далее обработку повторяли, как описано выше: в/о введение *Y. enterocolitica* ДНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека ($7,5 \times 10^7$ бактерий), или контрольного стерильного PBS выполняли в дни 0, 1, 3, 6, 10, 14; в/б инъекции антител IgG2b крысы (антитела против PD-L1 или контрольного изотипического антитела) в

дозе 10 мг/кг выполняли в дни 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, и/или в/б инъекции антител IgG2a крысы (антитела против PD-1 или контрольного изотипического антитела) в дозе 10 мг/кг выполняли в дни 0, 4, 8 и 12. В дни 0, 7 и 14, приблизительно за час до инъекции бактерий или стерильного контрольного PBS, мышам вводили 8 мг/мл (10 мл/кг) раствор десферала путем в/б инъекции. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью штангенциркуля. Объем опухоли определяли как $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширину}^2$. Объем опухоли, превышающий 1500 мм³, задавали как гуманный конечный показатель. В соответствующие дни после инфекции мышей умерщвляли посредством передозировки при газовой анестезии (изофлураном) с последующим смещением шейных позвонков или обескровливанием.

Культура клеток, препарат бактерий и инфекция для анализа *in vitro*. Клетки B16 Blue ISG (приобретенные у InvivoGen) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% ЭТС и 2 mM L-глутамин. Замороженный базовый раствор *Y. enterocolitica* (7% базового раствора бактерий, выращенных до ОП₆₀₀= 8 и хранившихся при -80°C, с ДМСО) разбавляли свежим ВНИ до ОП₆₀₀, равной 0,1, и выращивали в течение 2 ч при к.т. на орбитальном шейкере (150 об/мин), а затем повышали температуру до 37 °C на качалке с водяной баней (150 об/мин) в течение еще 1 ч. Наконец, бактерии собирали путем центрифугирования (6000 ед. относительного центробежного ускорения в течение 60 сек), однократно промывали DMEM с добавлением 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамин, и ресуспендировали в той же среде. Концентрацию бактериальной суспензии корректировали на основе ОП₆₀₀. Клетки, посеянные в 96-луночные планшеты, инфицировали при указанных значениях MOI, планшеты центрифугировали в течение 1 мин при 500 g и помещали в условия 37 °C/5% CO₂ на указанное время.

25

Прямой анализ активации интерферона I типа. Клетки меланомы мыши B16F1, стабильно экспрессирующие секретлируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP) под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE, приобрели у InvivoGen (B16-Blue ISG). Условия роста и анализ ИФН I типа адаптировали на основании протоколов, предоставленных InvivoGen. Вкратце, 15000 клеток B16-Blue ISG в 150 микролитрах среды для анализа (RPMI + 2 mM L-глутамин + 10% ЭТС) на лунку высевали в

30

плоскодонный 96-луночный планшет (NUNC или Corning). На следующий день клетки инфицировали штаммами бактерий, подлежащими анализу, путем добавления 15 микролитров на лунку при желательной множественности заражения (MOI) с последующим кратковременным центрифугированием (500 g, 60 с, к.т.) Через 2 часа инкубирования (37 °С и 5% CO₂) бактерии убивали, добавляя среду для анализа, содержащую пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл), в течение 2 часов в инкубаторе (37 °С и 5% CO₂). Затем надосадочную жидкость удаляли, клетки промывали стерильным PBS и добавляли 100 мкл свежей среды для анализа, содержащей пенициллин/стрептомицин. Инкубирование продолжали в течение 16 ч.

Обнаружение SEAP выполняли согласно рекомендациям QUANTI-Blue™ (InvivoGen): 20 мкл супернатанта клеток инкубировали с 180 мкл реагента для обнаружения (QUANTI-Blue™, InvivoGen). Планшет инкубировали при температуре 37°С, активность SEAP измеряли путем считывания ОП при длине волны 650 нм с применением микропланшетного ридера (Molecular Devices).

15

В) РЕЗУЛЬТАТЫ

Комбинация ингибитора контрольной точки - антитела против PD-1 (в/б) с *Yersinia enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим mRig1-CARD₂ (в/о), способствует полной регрессии опухоли у мышей Balb/С с аллотрансплантатами клеток ЕМТ-6 (модель рака молочной железы).

Мышам Balb/с дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы ЕМТ-6 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или 7,5x10⁷ КОЕ (колониеобразующих единиц) *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (клон: RPM1-14, изотип: IgG2a крысы, Bioxcell, 10 мг/кг на инъекцию) или стерильный PBS в качестве контроля. Группы распределяли следующим образом (показано как в/о обработка + в/б обработка): PBS + PBS; *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; PBS + антитело против PD-1; *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1 (15 мышей/группу). После достижения объема опухолей 60-130 мм³ (средний размер 92 +/- 19 мм³) мышей

рандомизировали в группы и начинали обработку (день первой обработки задавали как день 0). В/о обработку выполняли в д0, д1, д5, д6, д10 и д11, а в/б обработку выполняли в д0, д4, д7 и д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней с помощью штангенциркуля.

- 5 При обработке средний размер опухоли в группе, получавшей комбинацию антитела против PD-1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, демонстрировал значительно более выраженное снижение роста опухоли по сравнению с каждой отдельно взятой обработкой (фиг. 9). Кроме того, контрольная группа (PBS/PBS) не демонстрировала регрессии опухоли (фиг. 10), в то время как введение
- 10 только CPI - антитела против PD-1 привело к 1 случаю полной регрессии (фиг. 12); обработка только *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, привело к 4 случаям полной регрессии (фиг. 11); а совместное введение CPI - антитела против PD-1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, привело к 7 случаям полной регрессии (фиг. 13).
- 15 Кроме того, графики выживаемости Каплана-Мейера (фиг. 14) демонстрировали, что ни одна мышь контрольной группы (PBS/PBS) не выжила до 66 дней после первой обработки. В группе, получавшей только антитело против PD-1, 7% мышей выжили в конце исследования. В группе, получавшей *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, 27% мышей выжили в конце исследования. В группе,
- 20 получавшей *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующей YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, в комбинации с антителом против PD-1, 47% мышей выжили в конце исследования. Мышам, у которых первые опухоли ЕМТ6 были необнаружимыми (0 мм³), либо их размер составлял менее 25 мм³, затем повторно выполняли инъекцию опухолевых клеток ЕМТ-6 в противоположный бок. Это имело место на 66 день. Ни у одной из
- 25 мышей после повторного введения не развилась опухоль, в то время как у всех наивных мышей, которым впервые вводили клетки ЕМТ-6, развились опухоли (фиг. 15).
- Кроме того, при в/о введении *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, произошла умеренная, но временная потеря массы тела. Многократные в/о дозы не приводили к прогрессирующей потере веса. Добавление CPI
- 30 - антитела против PD-1 к *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующему YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, не увеличивало потерю массы тела по сравнению с введением только *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши.

Эти результаты подчеркивают, что в модели рака молочной железы бактерии, использующие систему T3SS для доставки белков, индуцирующих ИФН I типа, в комбинации с CPI - антителом против PD-1, позволили значительно улучшить
 5 результат лечения (средний объем опухоли, количество случаев полной регрессии, вероятность выживания) по сравнению с любой отдельно взятой обработкой, что обеспечило неожиданную синергетическую противоопухолевую активность.

**Комбинация ингибиторов контрольных точек - антитела против PD-1 или
 10 антитела против CTLA-4 (в/б) с *Yersinia enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующим mRig1-CARD₂ (в/о), способствует полной регрессии опухоли у мышей C57BL/6J с аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10.**

Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или $7,5 \times 10^7$
 15 КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора уорЕ). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (клон: RPM1-14, изотип: IgG2a крысы, Bioxcell, 10 мг/кг на инъекцию) или антитело против CTLA-4 (клон: 9H10, изотип: IgG1 хомяка, Bioxcell, 10
 20 мг/кг на инъекцию) или стерильный PBS в качестве контроля. Группы распределяли следующим образом (показано как в/о обработка + в/б обработка): PBS + PBS; *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + PBS; PBS + антитело против PD-1; *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1; PBS + антитело против CTLA-4; *Y. enterocolitica*
 25 ΔHOPEMT, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против CTLA-4 (15 мышей/группу).

После достижения объема опухолей 30-120 мм³ (средний размер 71 +/- 25 мм³) мышей рандомизировали в группы и начинали обработку (день первой обработки задавали как день 0). В/о обработку выполняли в д0, д1, д2, д3, д6 и д9, а в/б обработку выполняли в
 30 д0, д4, д7, д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней с помощью штангенциркуля.

При обработке средний размер опухоли в группе, получавшей комбинацию антитела против PD-1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, а также антитела против CTLA-4 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, демонстрировал более выраженное снижение роста опухоли по сравнению с каждой отдельно взятой обработкой (фиг. 16 и 17). Кроме того, контрольная группа (PBS/PBS) не демонстрировала регрессии опухоли (фиг. 18); аналогичным образом, введение только антитела против PD-1 (фиг. 20) и только антитела против CTLA-4 (фиг. 21) также не демонстрировало полной регрессии опухоли. Инъекция только *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, привела к 3 случаям полной регрессии (фиг. 19); совместное введение CPI - антитела против PD-1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, привело к 4 случаям полной регрессии (фиг. 22); а совместное введение CPI - антитела против CTLA-4 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, привело к 4 случаям полной регрессии (фиг. 23).

Кроме того, графики выживаемости Каплана-Мейера (фиг. 24 и 25) показывают, что ни одна мышь контрольной группы (PBS/PBS), а также мыши, получавшие только антитело против PD-1 и только антитело против CTLA-4, соответственно, не выжили до конца исследования (71 день после первой обработки). В группе, получавшей *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующей YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, 20% мышей выжили в конце исследования. В обеих группах, получавших либо *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующей YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, в комбинации с антителом против PD-1, либо *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующей YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, в комбинации с антителом против CTLA-4, 27% мышей выжили в конце исследования. Кроме того, при в/о введении *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, произошла умеренная, но временная потеря массы тела. Многократные в/о дозы не приводили к прогрессирующей потере веса. Добавление CPI - антитела против PD-1 или антитела против CTLA-4 к *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующему YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, не увеличивало потерю массы тела по сравнению с введением только *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши.

Эти результаты подчеркивают, что в модели меланомы бактерии, использующие систему T3SS для доставки белков, индуцирующих ИФН I типа, в комбинации с CPI - антителом против PD-1 или антителом против CTLA-4 позволили значительно улучшить результат лечения (количество случаев полной регрессии, средний объем 5 опухоли, вероятность выживания) по сравнению с любой отдельно взятой обработкой, что обеспечило неожиданную синергетическую противоопухолевую активность.

Комбинация ингибитора контрольной точки - антитела против PD-1 (в/б) с *Yersinia enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим CARD₂ mRig1 (в/в), способствует 10 полной регрессии опухоли у мышей C57BL/6J с аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10.

Мышам C57BL/6J дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток меланомы B16F10 посредством внутривенной (в/в) инъекции вводили стерильный PBS или 1×10^7 КОЕ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) на 15 среднекопийном векторе (который кодирует YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 или контрольный изотипический IgG (10 мг/кг на инъекцию). Группы распределяли следующим образом (показано как в/в обработка + в/б обработка): PBS + контрольный изотипический IgG; *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈- 20 CARD₂ RIG-I мыши + контрольный IgG; PBS + антитело против PD-1; *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши + антитело против PD-1, 15 мышей/группу.

После достижения объема опухолей 40-120 мм³ (средний размер 66 +/- 22 мм³) мышей 25 рандомизировали в группы и начинали обработку (день первой обработки задавали как день 0). В/в обработку выполняли в д0, д2, д4, д6, д9, д13, д16 и д20, а в/б обработку выполняли в д0, д4, д6, д9. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней с помощью штангенциркуля.

После обработки контрольная группа (PBS/контрольный IgG) не демонстрировала регрессии опухолей (фиг. 26). Введение только *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, 30 кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши или только антитела против PD-1 не приводило к полной регрессии опухоли (фиг. 27 и 28). Однако совместное введение CPI

- антитела против PD-1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, привело к 1 случаю полной регрессии (фиг. 29).

Кроме того, графики выживаемости Каплана-Мейера (фиг. 30) показывают, что ни одна мышь контрольной группы (PBS/контрольный IgG), а также мыши, получавшие только *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, и только антитело против PD-1, не выжили до конца исследования (23 дня после первой обработки). В группе, получавшей *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, в комбинации с антителом против PD-1, 20% мышей выжили в конце исследования. Кроме того, при в/в введении *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, произошла умеренная, но временная потеря массы тела. Многократные в/в дозы не приводили к прогрессирующей потере веса. При многократном в/в введении PBS и контрольного IgG потери массы тела не наблюдали. Добавление CPI - антитела против PD-1 к *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующему YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши, не увеличивало потерю массы тела по сравнению с введением только *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши.

Эти результаты подчеркивают, что в модели меланомы бактерии, использующие систему T3SS для доставки белков, индуцирующих ИФН I типа, в комбинации с CPI - антителом против PD-1 позволили значительно улучшить результат лечения (количество случаев полной регрессии, вероятность выживания) по сравнению с любой отдельно взятой обработкой, что обеспечило неожиданную синергетическую противоопухолевую активность.

Доставка Rig1-CARD₂ человека и мыши посредством T3SS индуцировала аналогичный уровень ИФН I типа в репортерной линии клеток меланомы B16F1
 Доставка CARD₂ RIG-I человека или CARD₂ RIG-I мыши приводила к индукции сигнального пути ИФН I типа в меланоцитах B16F1. ИФН-репортерные клетки B16F1 инфицировали *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ - либо контрольным штаммом, не доставляющим полезной нагрузки, либо штаммом, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека или YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши на среднекопийном векторе. Титрование бактерий, добавленных к клеткам, выполняли для каждого штамма и обозначали как

множественность заражения (МОИ). Стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE, которую измеряли по ОП₆₅₀. Результаты показывают, что
 5 доставка версий доменов Rig1-CARD₂ человека (аминокислоты 1-245 RIG-I человека) и мыши (аминокислоты 1-246 RIG-I мыши) вызвала индукцию ИФН I типа в клетках мыши на аналогичном уровне (фиг. 31). Аналогичные эксперименты, выполненные на линиях клеток человека, подтвердили, что доставка версий доменов Rig1-CARD₂ человека и мыши также вызвала индукцию ИФН I типа в клетках человека на
 10 аналогичном уровне.

Комбинация ингибиторов контрольных точек - антитела против PD-1 или антитела против PD-L1 (в/б) с *Yersinia enterocolitica* ΔHOPEMT CARD₂ hRig1 и h-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ (в/о) способствовала полной регрессии опухоли у мышей Balb/C с аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26.

Мышам Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток карциномы толстой кишки CT26 посредством внутриопухолевой (в/о) инъекции вводили стерильный PBS или $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₆) и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека (cGAS₁₆₁₋₅₂₂) как на плазмиде pYV, так
 20 и на среднекопийном векторе (где YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека кодируются под контролем промотора yopE). В комбинации мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело против PD-1 (BE0146, BioXcell; клон: RMP1-14; изотип: IgG2a крысы, 10 мг/кг на инъекцию) или антитело против PD-L1 (BP0101, BioXcell; клон: 10F.0G2; изотип: IgG2b крысы, 10 мг/кг на инъекцию) или
 25 соответствующие контрольные изотипические антитела (контрольный изотипический IgG2a: BE0089, BioXcell; клон: 2A3 и контрольный изотипический IgG2b: BE0090, BioXcell; клон: LTF-2, 10 мг/кг на инъекцию).

После достижения объема опухоли 30-120 мм³ (средний размер 58 +/- 19 мм³) мышей рандомизировали в группы и начинали обработку (день первой обработки задавали как
 30 день 0). В/о введение *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека ($7,5 \times 10^7$ бактерий), или контрольного стерильного PBS выполняли в дни 0, 1, 3, 6, 10, 14; в/б инъекции антител IgG2b крысы

- (антитела против PD-L1 или контрольного изотипического антитела) в дозе 10 мг/кг выполняли в дни 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, и/или в/б инъекции антител IgG2a крысы (антитела против PD-1 или контрольного изотипического антитела) в дозе 10 мг/кг выполняли в дни 0, 4, 8 и 12. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней с помощью штангенциркуля.
- 5 Группы распределяли следующим образом (показано как в/о обработка + в/б обработка): PBS + IgG2a + контрольные изотипические IgG2b; *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + контрольный изотипический IgG2b; PBS + антитело против PD-1; PBS + антитело против PD-L1; *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + антитело против PD-1; *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующий YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека + антитело против PD-L1 (13 мышей/группу).
- 10
- 15 При обработке средний размер опухоли в группе, получавшей комбинацию антитела против PD-1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, а также комбинацию антитела против PD-L1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, демонстрировал более выраженное снижение роста опухоли по сравнению с каждой отдельно взятой обработкой (фиг. 32 и 33). Кроме того, контрольная группа (PBS/контрольные изотипические IgG2a + IgG2b, фиг. 34), группа, получавшая только антитело против PD-1 (фиг. 36), и группа, получавшая только антитело против PD-L1 (фиг. 38), не демонстрировали регрессии опухоли, поскольку в конце исследования (или в день умерщвления) объем опухолей у всех мышей каждой группы увеличился более чем на 35% по сравнению с соответствующим объемом в день 0. Обработка *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, привела к 1 случаю опухоли, классифицированному как частичная регрессия (уменьшение объема опухоли от 50% до 95% по сравнению с днем 0, фиг. 35). Комбинированная обработка CPI - антителом против PD-1 и *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, привела к 1 случаю полной регрессии (фиг. 37); а комбинированная обработка CPI - антителом против PD-L1 и *Y. enterocolitica*
- 20
- 25
- 30

ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, привела к 1 случаю полной регрессии и 1 случаю опухоли, классифицированному как частичная регрессия (фиг. 39). Кроме того, оптимальный эффект ингибирования роста опухоли при различных видах обработки представлен на

5 фигуре 40 и фигуре 41. Ингибирование роста опухоли (соотношение экспериментальных/контрольных групп, T/C, в %) определяли как отношение медианных объемов опухоли в экспериментальных группах к медианным объемам опухоли у животных контрольной группы (которым вводили PBS и контрольные изотипические антитела). Оптимальным значением является минимальное

10 соотношение T/C%, отражающее максимальное достигнутое ингибирование роста опухоли (при n ≥ 4 животных). Соотношения T/C% классифицировали следующим образом: 0-10% - выраженная противоопухолевая активность, 10-30% - умеренная противоопухолевая активность, 30-60% - пограничная противоопухолевая активность, 60-100% - отсутствие противоопухолевой активности. Эту классификацию взяли из

15 литературных источников (Johnson et al., 2001) и адаптировали на основе внутренних данных. Кроме того, графики выживаемости Каплана-Мейера (фиг. 42) демонстрировали, что ни одна мышь контрольной группы (PBS/контрольные изотипические IgG2a и IgG2b) не выжила до 43 дня. В группе мышей, получавших только антитело против PD-L1, ни одна мышь не выжила до 43 дня. В группе,

20 получавшей только *Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ*, кодирующей YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, 8% мышей выжили до 43 дня. В группе, получавшей *Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ*, кодирующей YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, в комбинации с антителом против PD-L1, 23% мышей выжили до 43 дня.

25 Кроме того, в группах, получавших в/о обработку *Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ*, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, наблюдали умеренную, но временную потерю массы тела. Многократные в/в дозы не приводили к прогрессирующей потере массы тела, общая потеря массы тела была легкой и временной, после периода обработки мыши начали восстанавливаться.

30 Добавление CPI - антитела против PD-1 или антитела против PD-L1 к *Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ*, кодирующему YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека, не увеличивало потерю массы тела по сравнению с введением только *Y.*

enterocolitica ΔНОРЕМТ, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека.

Эти результаты подчеркивают, что в модели карциномы СТ26 у мышей бактерии, использующие систему T3SS для доставки белков, индуцирующих ИФН I типа, в комбинации с CPI - антителом против PD-1 или антителом против PD-L1 позволили значительно улучшить результат лечения (количество случаев полной или частичной регрессии, средний объем опухоли, вероятность выживания) по сравнению с любой отдельно взятой обработкой, что обеспечило неожиданную синергетическую противоопухолевую активность.

Таким образом, комбинированная обработка *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) (в/о или в/в) или *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS₁₆₁₋₅₂₂ человека (в/о) вместе с в/б инъекцией CPI - антитела против PD-1, антитела против PD-L1 или антитела против CTLA-4, оценивали в различных моделях злокачественных солидных опухолей у мышей на предмет ее влияния на прогрессирование опухоли в различных моделях солидных опухолей у животных, а также на вероятность выживания и относительные изменения массы тела. Результаты продемонстрировали значительно улучшенный исход обработки по сравнению с любой отдельно взятой обработкой, демонстрируя в целом неожиданную синергетическую противоопухолевую активность. Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, что версии RIG-I-CARD₂ мыши и человека индуцируют аналогичный уровень ИФН I типа и, таким образом, являются функционально эквивалентными.

25

Цитируемые источники

- 5 Agresta, L., K.H.N. Hoebe, and E.M. Janssen. 2018. The Emerging Role of CD244 Signaling in Immune Cells of the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 9:2809.
- Alto, N.M., and J.E. Dixon. 2008. Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol.* 439:131-143.
- 10 Alto, N.M., F. Shao, C.S. Lazar, R.L. Brost, G. Chua, S. Mattoo, S.A. McMahon, P. Ghosh, T.R. Hughes, C. Boone, and J.E. Dixon. 2006. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell.* 124:133-145.
- Alton, N.K., and D. Vapnek. 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature.* 282:864-869.
- 15 Balzano, C., N. Buonavista, E. Rouvier, and P. Golstein. 1992. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int J Cancer Suppl.* 7:28-32.
- Bodmer, J.-L., P. Schneider, and J. Tschopp. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences.* 27:19-26.
- Brenner, D., and T.W. Mak. 2009. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol.* 21:871-877.
- 20 Brisse, M., and H. Ly. 2019. Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. *Front Immunol.* 10:1586.
- Carretero-Gonzalez, A., D. Lora, I. Ghanem, J. Zugazagoitia, D. Castellano, J.M. Sepulveda, J.A. Lopez-Martin, L. Paz-Ares, and G. de Velasco. 2018. Analysis of response rate with ANTI PD1/PD-L1 monoclonal antibodies in advanced solid tumors: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Oncotarget.* 9:8706-8715.
- 25 Chalah, A., and R. Khosravi-Far. 2008. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol.* 615:25-45.
- 30 Cheng, L., and Z. Ruan. 2015. Tim-3 and Tim-4 as the potential targets for antitumor therapy. *Hum Vaccin Immunother.* 11:2458-2462.
- Cogdill, A.P., M.C. Andrews, and J.A. Wargo. 2017. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br J Cancer.* 117:1-7.
- Cornelis, G.R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* 4:811-825.
- 35 Dayoub, A.S., and R.A. Brekken. 2020. TIMs, TAMs, and PS- antibody targeting: implications for cancer immunotherapy. *Cell Commun Signal.* 18:29.
- de Streel, G., C. Bertrand, N. Chalon, S. Lienart, O. Bricard, S. Lecomte, J. Devreux, M. Gaignage, G. De Boeck, L. Marien, I. Van De Walle, B. van der Woning, M. Saunders, H. de Haard, E. Vermeersch, W. Maes, H. Deckmyn, P.G. Coulie, N. van Baren, and S. Lucas. 2020. Selective inhibition of TGF-beta1 produced by GARP-expressing Tregs overcomes resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer. *Nat Commun.* 11:4545.
- 40 Diepold, A., M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal, and G.R. Cornelis. 2010. Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *EMBO J.* 29:1928-1940.
- 45 Eisenhauer, E.A., P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, and J. Verweij. 2009. New response evaluation

- criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 45:228-247.
- Feldman, M.F., S. Muller, E. Wuest, and G.R. Cornelis. 2002. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol*. 46:1183-1197.
- 5 Forsberg, A., and H. Wolf-Watz. 1990. Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *Journal of bacteriology*. 172:1547-1555.
- Fuchs, Y., and H. Steller. 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 147:742-758.
- 10 Gray-Owen, S.D., and R.S. Blumberg. 2006. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 6:433-446.
- Hodi, F.S. 2010. Overcoming immunological tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4. *Asia Pac J Clin Oncol*. 6 Suppl 1:S16-23.
- 15 Holder, K.A., and M.D. Grant. 2020. TIGIT Blockade: A Multipronged Approach to Target the HIV Reservoir. *Front Cell Infect Microbiol*. 10:175.
- Howard, S.L., M.W. Gaunt, J. Hinds, A.A. Witney, R. Stabler, and B.W. Wren. 2006. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *Journal of bacteriology*. 188:3645-3653.
- 20 Iriarte, M., I. Stainier, and G.R. Cornelis. 1995. The rpoS gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun*. 63:1840-1847.
- Isberg, R.R., D.L. Voorhis, and S. Falkow. 1987. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell*. 50:769-778.
- 25 Ito, K., K. Stannard, E. Gabutero, A.M. Clark, S.Y. Neo, S. Onturk, H. Blanchard, and S.J. Ralph. 2012. Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 31:763-778.
- 30 Ittig, S., C. Schmutz, C.A. Kasper, M. Amstutz, A. Schmidt, L. Sauteur, M.A. Vigano, S.H. Low, M. Affolter, G.R. Cornelis, E.A. Nigg, and C. Arriemerlou. 2015. A bacterial type III secretion-based protein delivery tool for broad applications in cell biology. *The Journal of cell biology*. 211:913-931.
- Johnson, J.I., S. Decker, D. Zaharevitz, L.V. Rubinstein, J.M. Venditti, S. Schepartz, S. Kalyandrug, M. Christian, S. Arbuck, M. Hollingshead, and E.A. Sausville. 2001. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*. 84:1424-1431.
- 35 Kang, X., J. Kim, M. Deng, S. John, H. Chen, G. Wu, H. Phan, and C.C. Zhang. 2016. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle*. 15:25-40.
- 40 Kaniga, K., I. Delor, and G.R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*. 109:137-141.
- Kranzusch, P.J., A.S. Lee, J.M. Berger, and J.A. Doudna. 2013. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep*. 3:1362-1368.
- 45 Liu, X., N. Shin, H.K. Koblish, G. Yang, Q. Wang, K. Wang, L. Leffet, M.J. Hansbury, B. Thomas, M. Rugar, P. Waeltz, K.J. Bowman, P. Polam, R.B. Sparks, E.W. Yue, Y. Li, R. Wynn, J.S. Fridman, T.C. Burn, A.P. Combs, R.C. Newton, and

- P.A. Scherle. 2010. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*. 115:3520-3530.
- Mathews, D.V., Y. Dong, L.B. Higginbotham, S.C. Kim, C.P. Breeden, E.A. Stobert, J. Jenkins, J.Y. Tso, C.P. Larsen, and A.B. Adams. 2018. CD122 signaling in CD8+ memory T cells drives costimulation-independent rejection. *J Clin Invest*. 128:4557-4572.
- McArdel, S.L., C. Terhorst, and A.H. Sharpe. 2016. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol*. 164:10-20.
- Metcalf, W.W., W. Jiang, and B.L. Wanner. 1994. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene*. 138:1-7.
- Meylan, F., A.C. Richard, and R.M. Siegel. 2011. TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. *Immunol Rev*. 244:188-196.
- Mita, Y., M.Y. Kimura, K. Hayashizaki, R. Koyama-Nasu, T. Ito, S. Motohashi, Y. Okamoto, and T. Nakayama. 2018. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *Int Immunol*. 30:559-567.
- Mota, L.J., and G.R. Cornelis. 2005. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med*. 37:234-249.
- Mulder, B., T. Michiels, M. Simonet, M.P. Sory, and G. Cornelis. 1989. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun*. 57:2534-2541.
- Murata, K., and M.C. Dalakas. 1999. Expression of the costimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28, and their mRNA in inflammatory myopathies. *Am J Pathol*. 155:453-460.
- Neubauer, H., S. Aleksic, A. Hensel, E.J. Finke, and H. Meyer. 2000. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol*. 290:61-64.
- Obiedat, A., Y. Charpak-Amikam, J. Tai-Schmiedel, E. Seidel, M. Mahameed, T. Avril, N. Stern-Ginossar, L. Springuel, J. Bolsee, D.E. Gilham, P. Dipta, M. Shmuel, E. Chevet, O. Mandelboim, and B. Tirosh. 2020. The integrated stress response promotes B7H6 expression. *J Mol Med (Berl)*. 98:135-148.
- Oflazoglu, E., I.S. Grewal, and H. Gerber. 2009. Targeting CD30/CD30L in oncology and autoimmune and inflammatory diseases. *Adv Exp Med Biol*. 647:174-185.
- Pardoll, D.M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 12:252-264.
- Pelludat, C., M. Hogardt, and J. Heesemann. 2002. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun*. 70:1832-1841.
- Platten, M., N. von Knebel Doeberitz, I. Oezen, W. Wick, and K. Ochs. 2014. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Front Immunol*. 5:673.
- Ramamurthi, K.S., and O. Schneewind. 2005. A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *Journal of bacteriology*. 187:707-715.

- Sambrook, J. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. D.W. Russell, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. .
- Sarker, M.R., C. Neyt, I. Stainier, and G.R. Cornelis. 1998. The Yersinia Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol.* 180:1207-1214.
- Seiffert, M., P. Brossart, C. Cant, M. Cella, M. Colonna, W. Brugger, L. Kanz, A. Ullrich, and H.J. Buhning. 2001. Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood.* 97:2741-2749.
- Seymour, L., J. Bogaerts, A. Perrone, R. Ford, L.H. Schwartz, S. Mandrekar, N.U. Lin, S. Litiere, J. Dancey, A. Chen, F.S. Hodi, P. Therasse, O.S. Hoekstra, L.K. Shankar, J.D. Wolchok, M. Ballinger, C. Caramella, E.G.E. de Vries, and R.w. group. 2017. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol.* 18:e143-e152.
- Sheu, B.C., S.H. Chiou, H.H. Lin, S.N. Chow, S.C. Huang, H.N. Ho, and S.M. Hsu. 2005. Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Res.* 65:2921-2929.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In vivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria. *Bio-Technol.* 1:784-791.
- Skeate, J.G., M.E. Otsmaa, R. Prins, D.J. Fernandez, D.M. Da Silva, and W.M. Kast. 2020. TNFSF14: LIGHTing the Way for Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 11:922.
- Skurnik, M., and H. Wolf-Watz. 1989. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of Yersinia spp. *Mol Microbiol.* 3:517-529.
- Sledzinska, A., L. Menger, K. Bergerhoff, K.S. Peggs, and S.A. Quezada. 2015. Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy. *Mol Oncol.* 9:1936-1965.
- Sory, M.P., and G.R. Cornelis. 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. *Mol Microbiol.* 14:583-594.
- Suzuki, S., T. Ishida, K. Yoshikawa, and R. Ueda. 2016. Current status of immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 46:191-203.
- Thomson, N.R., S. Howard, B.W. Wren, M.T. Holden, L. Crossman, G.L. Challis, C. Churcher, K. Mungall, K. Brooks, T. Chillingworth, T. Feltwell, Z. Abdellah, H. Hauser, K. Jagels, M. Maddison, S. Moule, M. Sanders, S. Whitehead, M.A. Quail, G. Dougan, J. Parkhill, and M.B. Prentice. 2006. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity Yersinia enterocolitica strain 8081. *PLoS Genet.* 2:e206.
- Trosky, J.E., A.D. Liverman, and K. Orth. 2008. Yersinia outer proteins: Yops. *Cellular microbiology.* 10:557-565.
- Waldman, A.D., J.M. Fritz, and M.J. Lenardo. 2020. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 20:651-668.
- Waugh, D.S. 2011. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif.* 80:283-293.

- Wolke, S., N. Ackermann, and J. Heesemann. 2011. The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol.* 13:1339-1357.
- 5 Yoneda, Y., T. Semba, Y. Kaneda, R.L. Noble, Y. Matsuoka, T. Kurihara, Y. Okada, and N. Imamoto. 1992. A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res.* 201:313-320.
- 10 Zhu, Y., B.L. Knolhoff, M.A. Meyer, T.M. Nywening, B.L. West, J. Luo, A. Wang-Gillam, S.P. Goedegebuure, D.C. Linehan, and D.G. DeNardo. 2014. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* 74:5057-5069.

Формула изобретения

1) Фармацевтическая комбинация, содержащая:

- 5 (a) рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент и присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного
- 10 белка, функционально связана с промотором;
- (b) модулятор иммунной контрольной точки (ICM); и, необязательно,
- (c) один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей.

15 2) Фармацевтическая комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), или его фрагмент.

3) Фармацевтическая комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что указанный

20 гетерологичный белок или его фрагмент предпочтительно представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, или его фрагмент, выбранный из группы, состоящей из белков семейства RIG-I-подобного рецептора (RLR), или их фрагментов, других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусных сигнальных путях и индукции ИФН I типа, или их фрагментов, и

25 ферментов, образующих циклические динуклеотиды, например циклаз циклического ди-АМФ, циклаз циклического ди-ГМФ и циклаз циклического ди-ГАМФ, выбранных из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, которые приводят к стимуляции STING, или их фрагментов.

30 4) Фармацевтическая комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, или его фрагмент, выбранный из группы,

состоящей из RIG1, MDA5, LGP2, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагмента.

5) Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что ICM
 5 представляет собой активатор или ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, B7-H1 (PDL1 или CD274), B7-DC (PD-L2 или CD273), CTLA-4 (CD152), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), LAG-3 (CD223), MHC-I, MHC-II, TIM-3 (HAVcr-2), Gal9 (галектина 9), TIM3-L, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), TIGIT, PVR (CD155), нектин-2 (CD112 или PVRL2), PVRIG, PVRL3 (CD113), PVRL1 (CD111),
 10 DNAM-1 (CD226), KIR2DL5 (CD158f), TACTILE (CD96), VISTA (B7-H5), IDO, OX40 (CD134), OX40L (CD252), CD137 (41BB), Cd137L (41BB-L), ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2 или CD275 или B7RP1), KIR, белков KIRDS (KIR2DSs и KIR3DSs), белков KIRDL (KIR2DLs и KIR3DLs), A2aR, CD27, CD70 (CD27L), BTLA, HVEM, GITR, GITRL, CD40, CD40L (CD154), TIM-1, CEACAM1, ICAM, LFA-1, CD2, CD160, HVEM, CD226,
 15 Cd112, PIR-B (gp49B), CD85J, CD85D, CD85A, CD85K, CD85C (LIR1, LIR2, LIR3, LIR5 и LIR8); ILT2, ILT4, ILT5, ILT3, SIRP-альфа, CD47, GARP, TGF-бета1, TDO, CD94, NKG2A, HLA-E, CSF1, CSF1R, 2B4 (CD244), CD229 (SLAMF3) и CD48 (SLAMF2).

б) Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что ICM
 20 представляет собой ингибитор молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2.

7) Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что
 25 указанный ICM представляет собой антагонист PD-1 или антагонист CTLA-4.

8) Фармацевтическая комбинация по п. 7, отличающаяся тем, что указанный антагонист PD-1 представляет собой антагонистическое антитело против PD-1.

9) Фармацевтическая комбинация по п. 8, отличающаяся тем, что указанное
 30 антагонистическое антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, цемиплимаба, тислелизумаба, торипалимаба, камрелизумаба, синтилимаба, ретифанлимаба, пролголимаба (BCD-100), серплулимаба

(HLX10), спартализумаба, АК105, авелумаба, атезолизумаба, дурвалумаба и сугемалимаба.

5 10) Фармацевтическая комбинация по п. 7, отличающаяся тем, что указанный антагонист CTLA-4 представляет собой антагонистическое антитело против CTLA-4.

11) Фармацевтическая комбинация по п. 10, отличающаяся тем, что указанное антагонистическое антитело против CTLA-4 выбрано из ипилимумаба и тремелимумаба.

10

12) Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Yersinia*.

15 13) Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-12 для применения в качестве лекарственного средства.

14) Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-12 для применения в способе профилактики, задержки прогрессирования или лечения рака у субъекта.

20

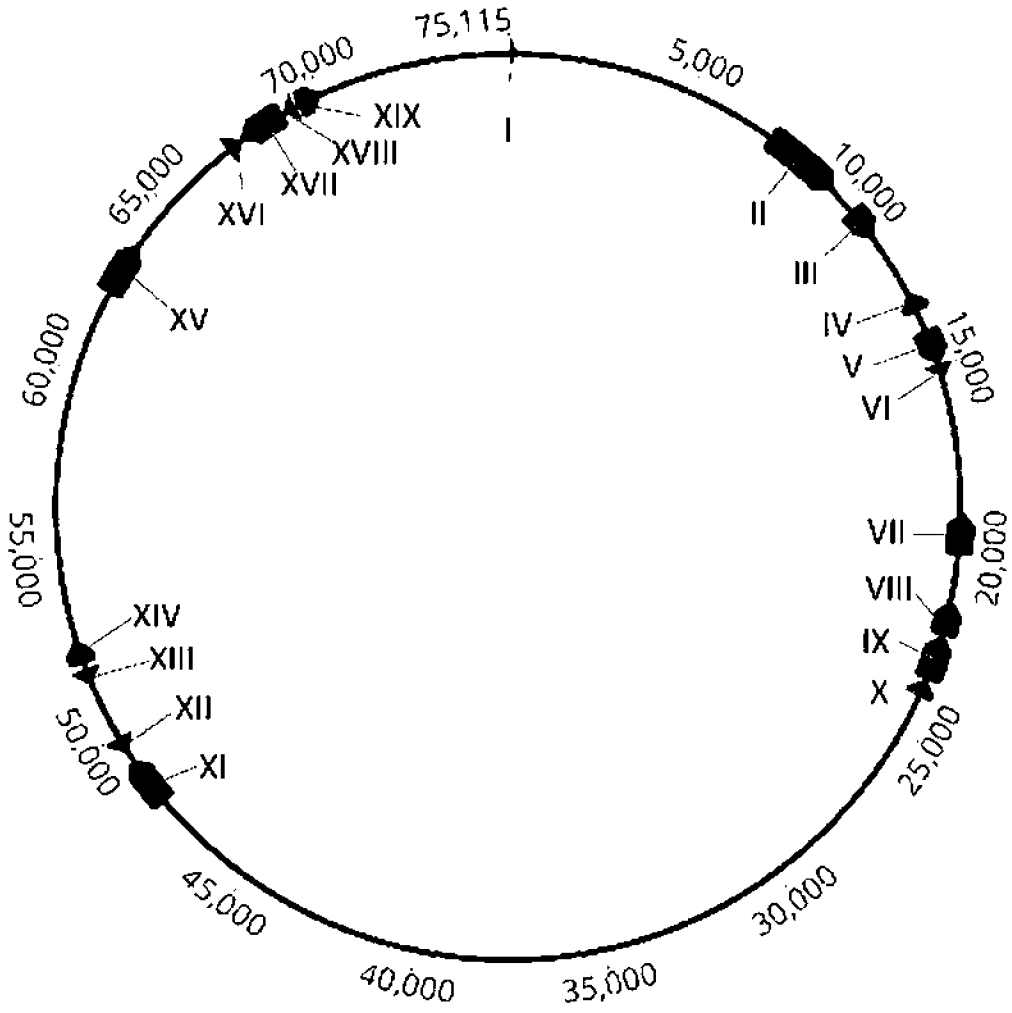
15) Составной набор, содержащий первый контейнер, второй контейнер и вкладыш в упаковку, причем первый контейнер содержит по меньшей мере одну дозу лекарственного средства, содержащего рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии, содержащий молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, присоединенную с соблюдением рамки считывания к 3'-концу нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, при этом второй контейнер содержит по меньшей мере одну дозу лекарственного средства, содержащего ингибитор иммунной контрольной точки (ICM),

25

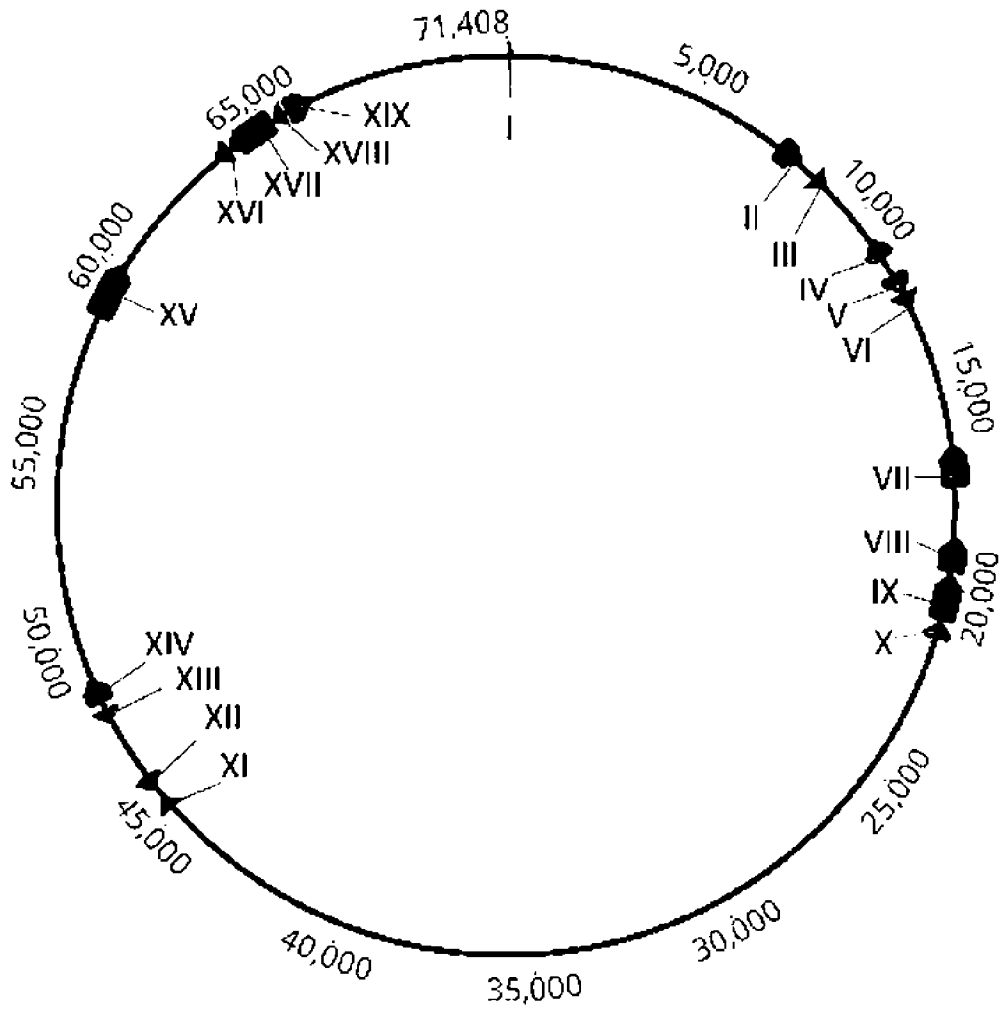
30

а вкладыш в упаковку обязательно содержит инструкции по лечению субъекта от рака с применением указанных лекарственных средств.

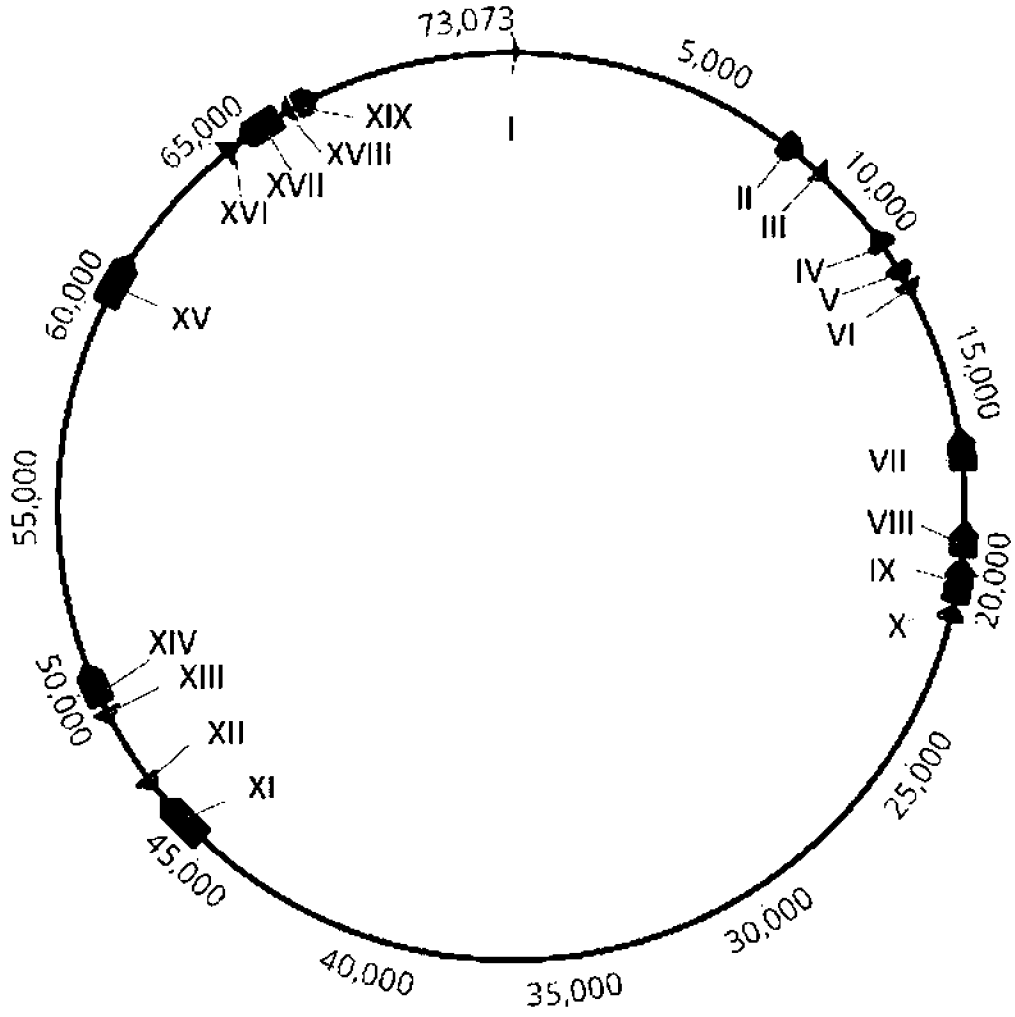
Фигура 1



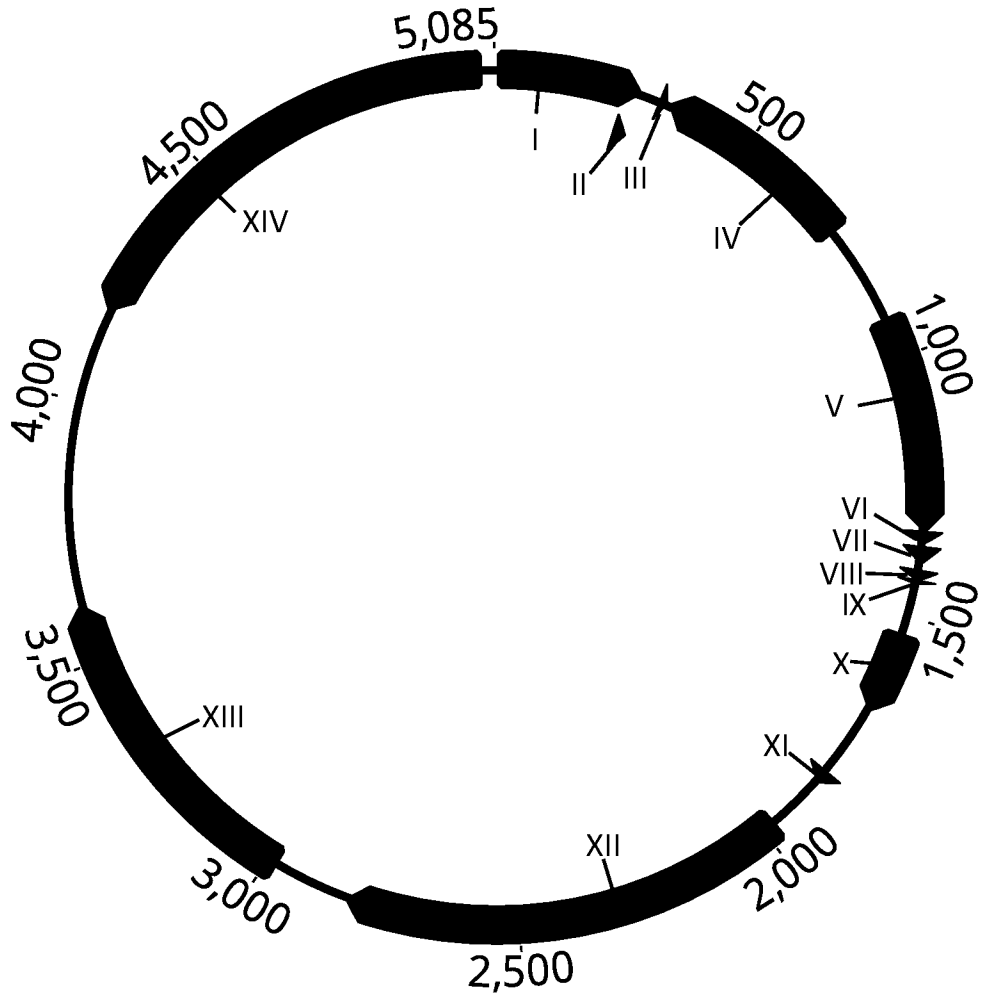
Фигура 2



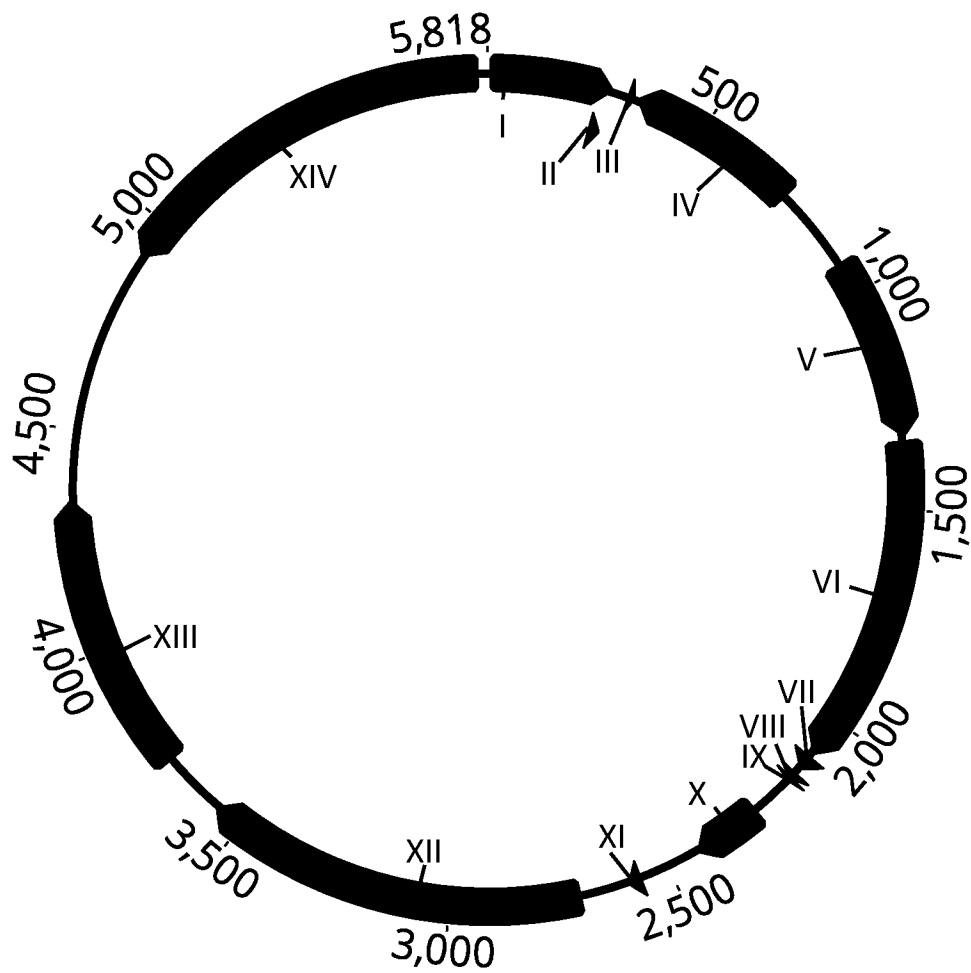
Фигура 3



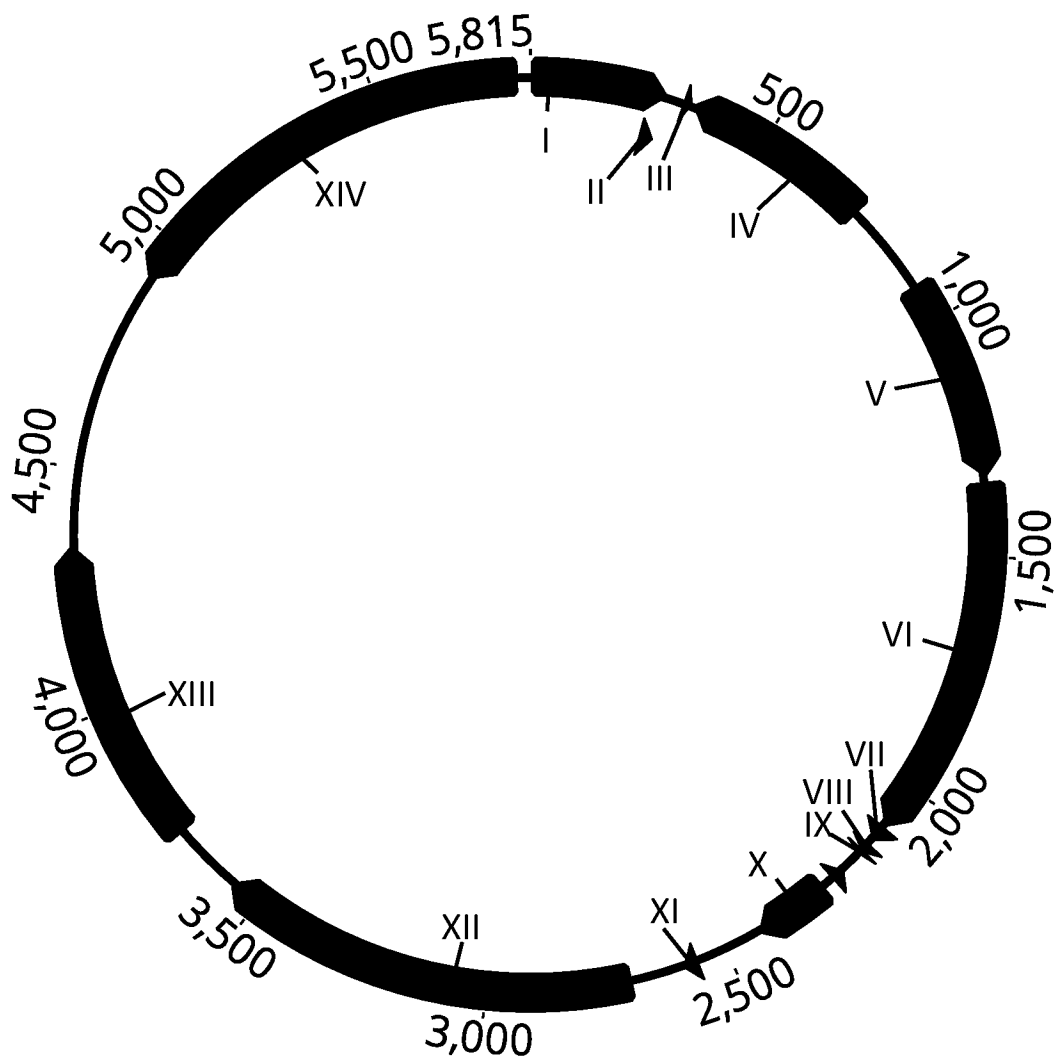
Фигура 4



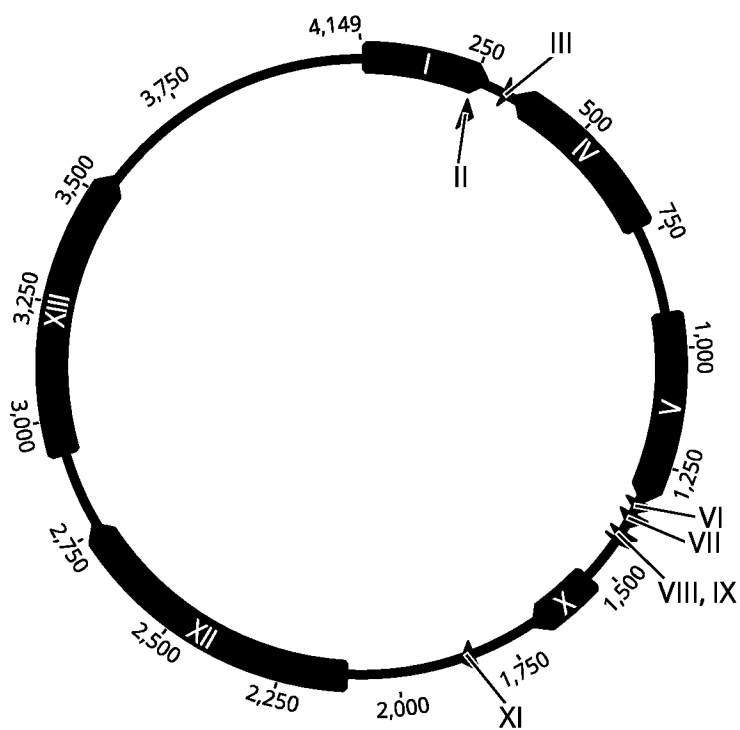
Фигура 5



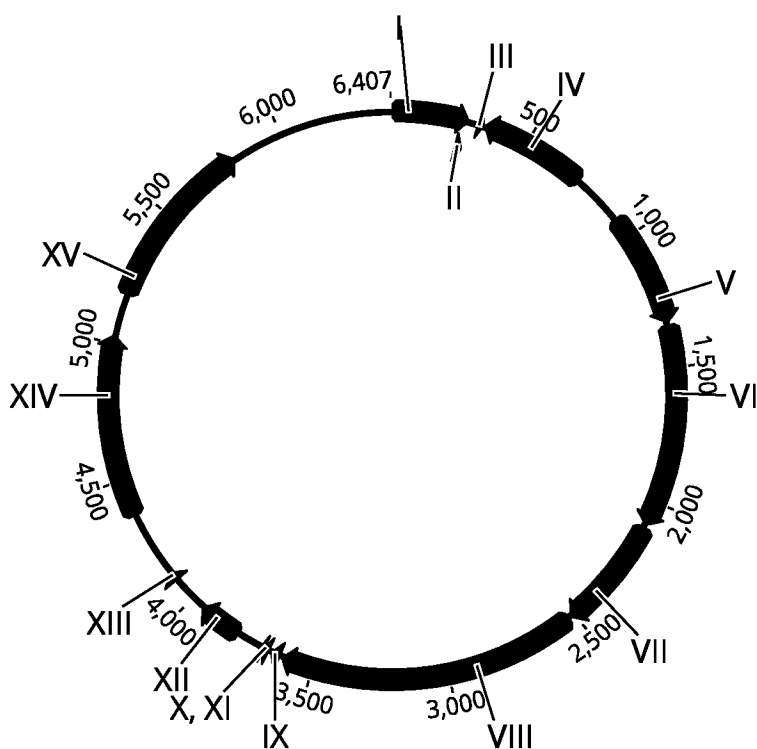
Фигура 6



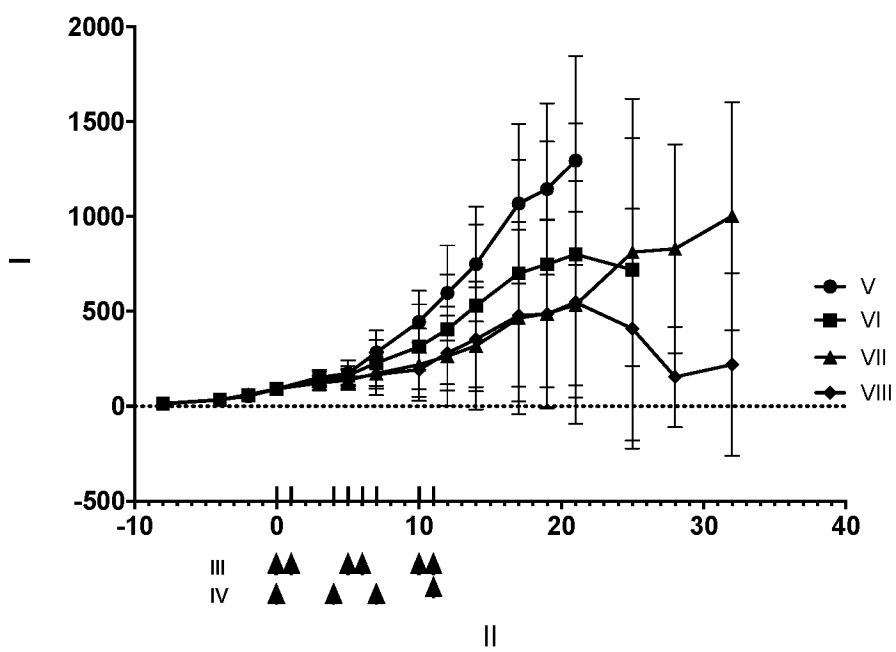
7/43
Фигура 7



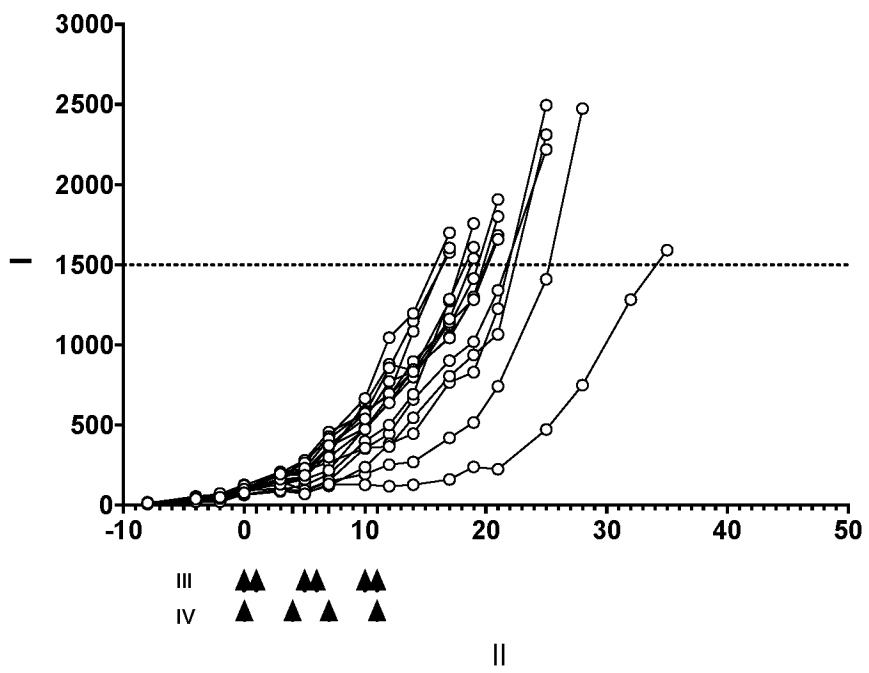
8/43
Фигура 8



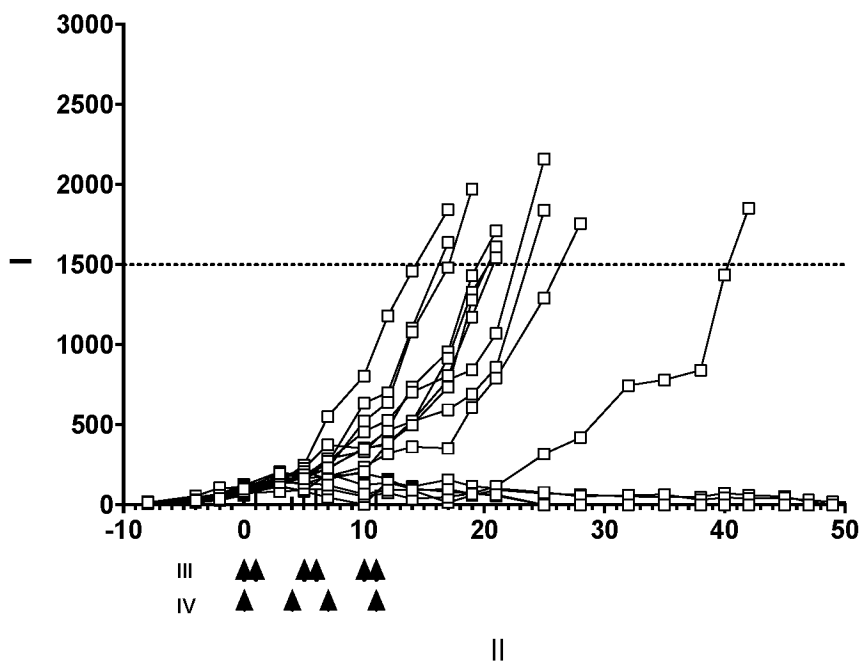
9/43
Фигура 9



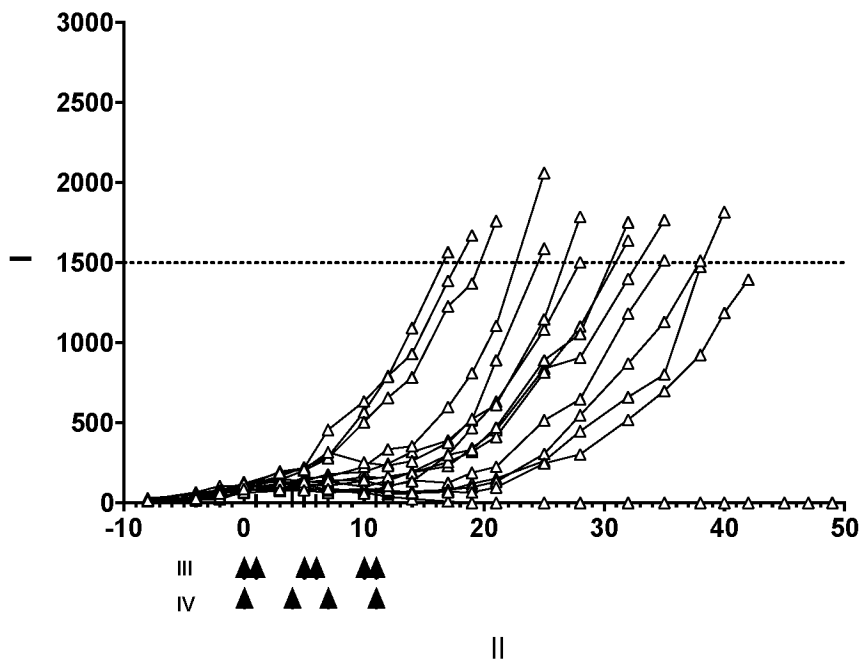
10/43
Фигура 10



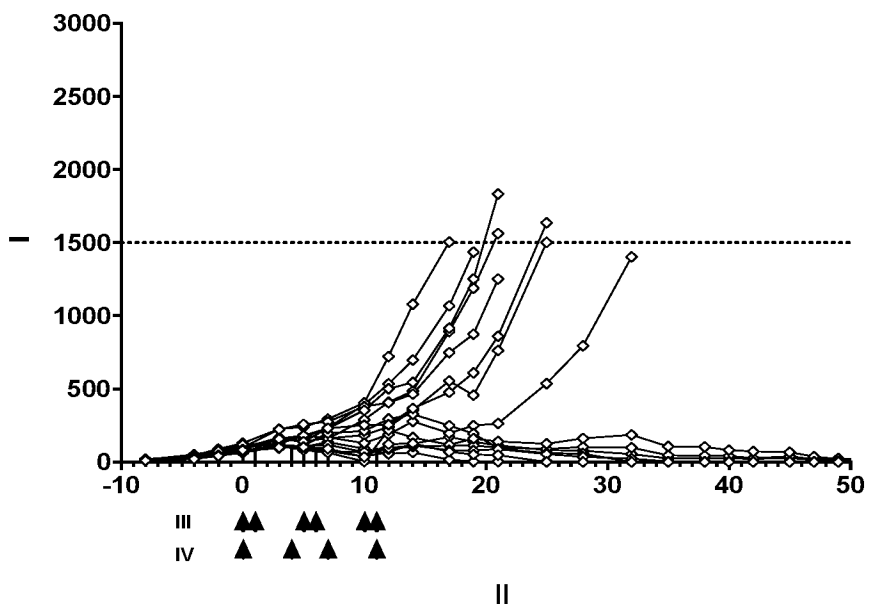
11/43
Фигура 11



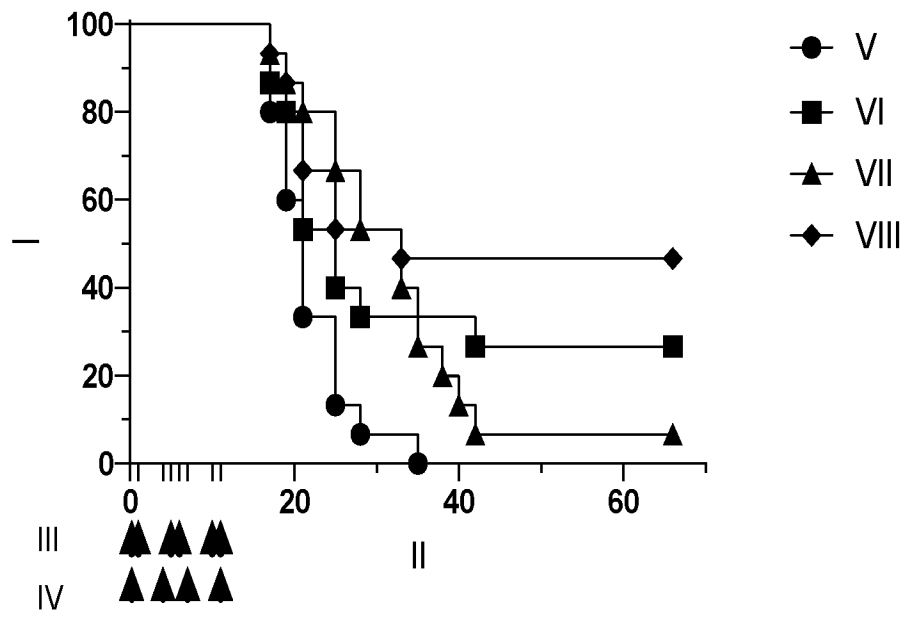
12/43
Фигура 12



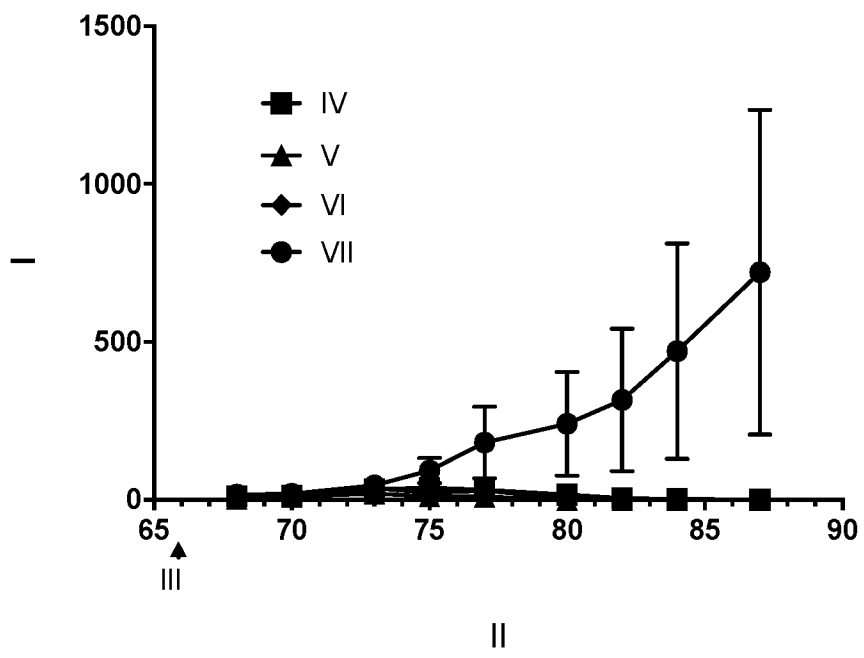
13/43
Фигура 13



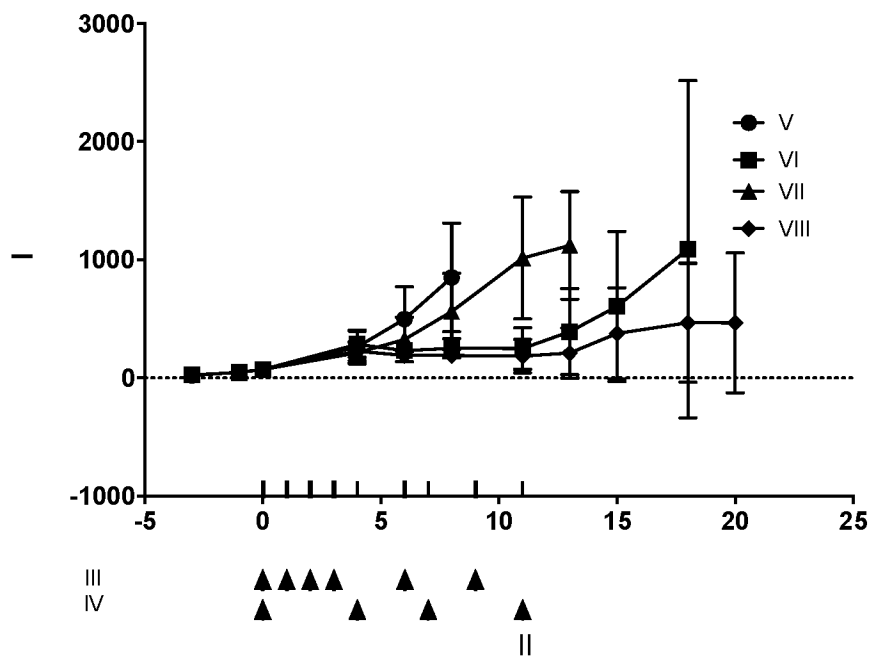
14/43
Фигура 14



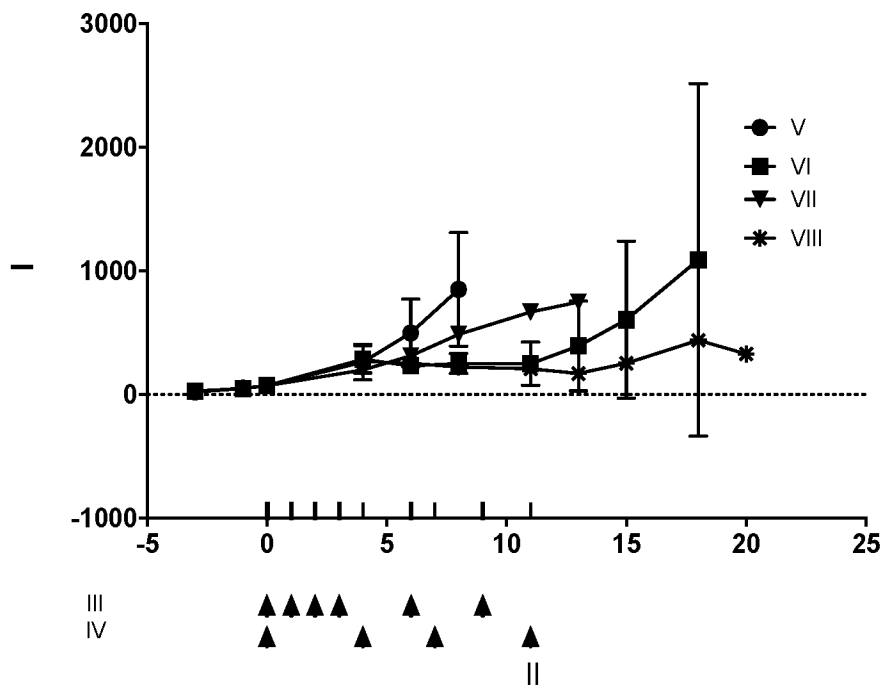
15/43
Фигура 15



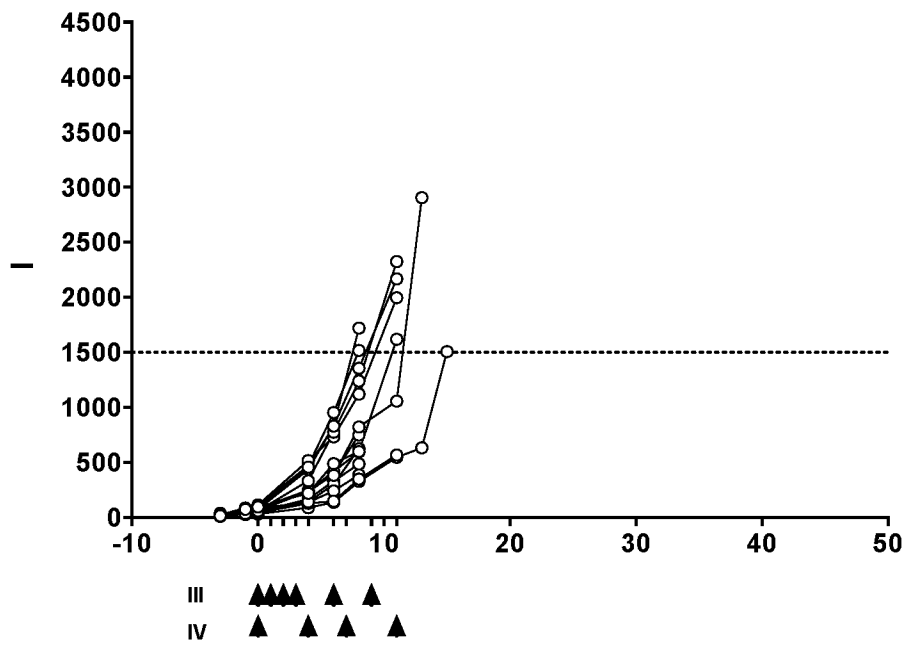
16/43
Фигура 16



17/43
Фигура 17

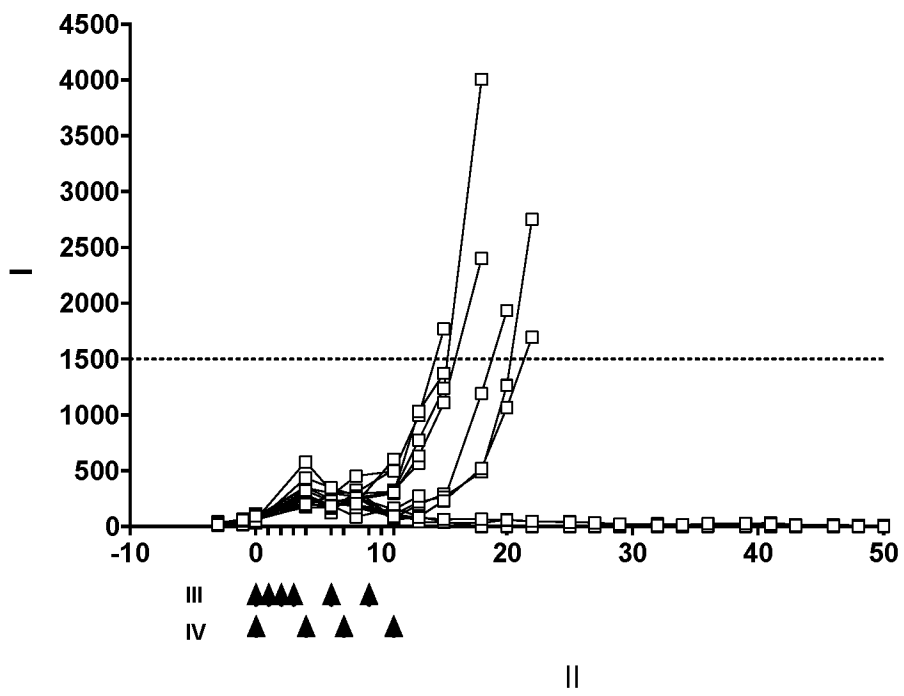


18/43
Фигура 18

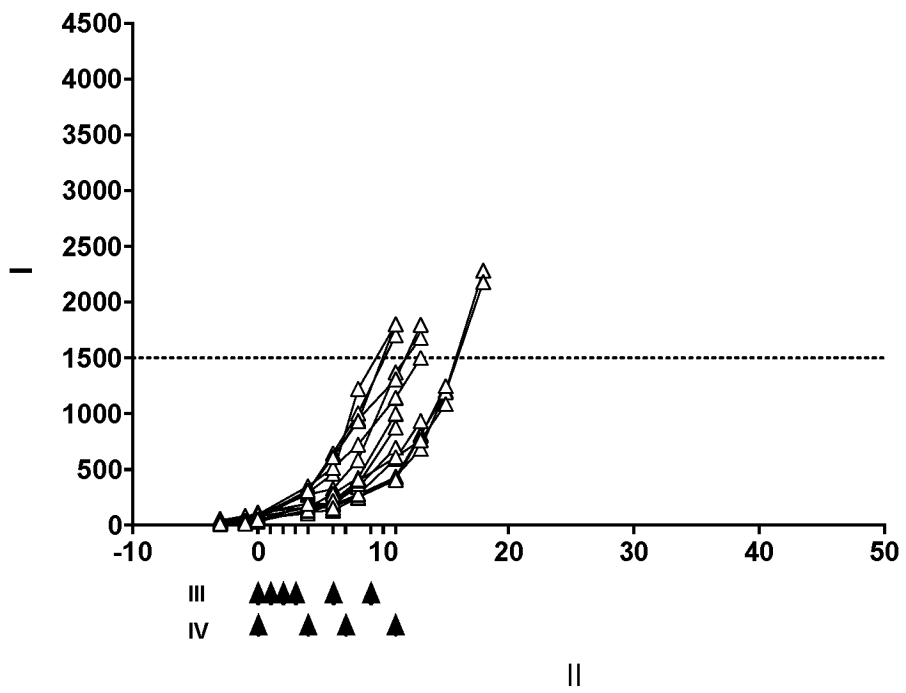


II

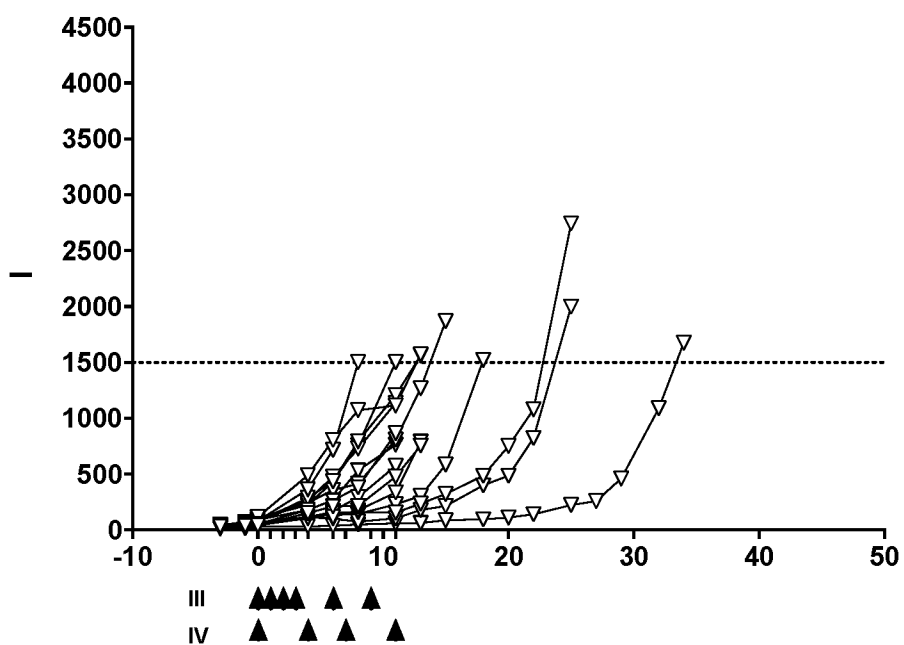
19/43
Фигура 19



20/43
Фигура 20

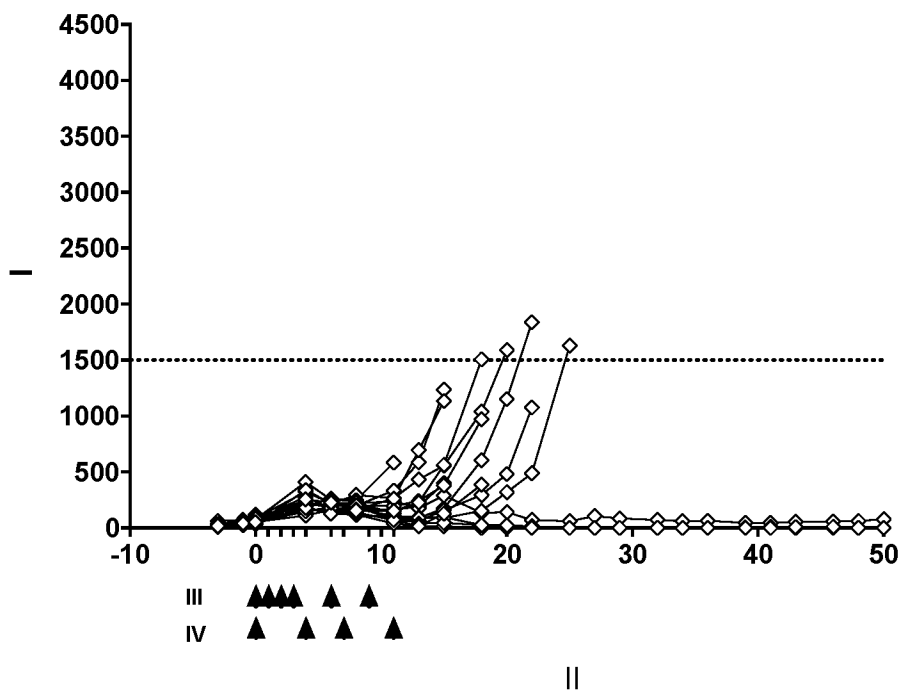


21/43
Фигура 21

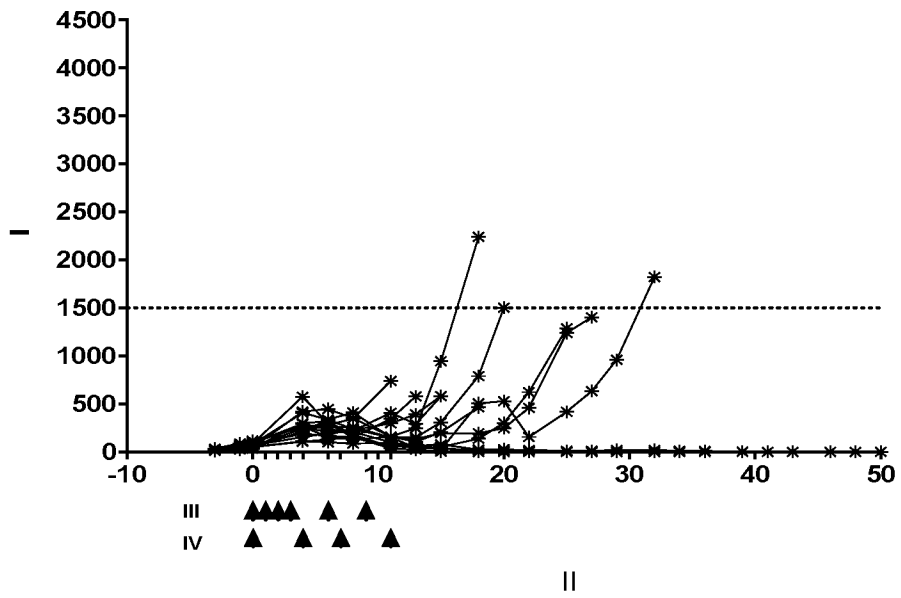


II

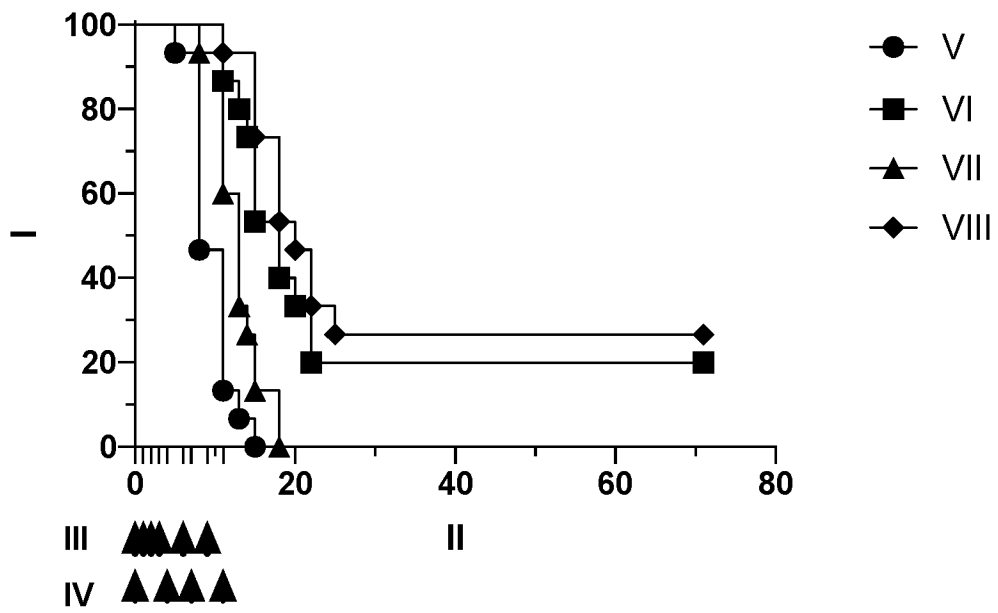
22/43
Фигура 22



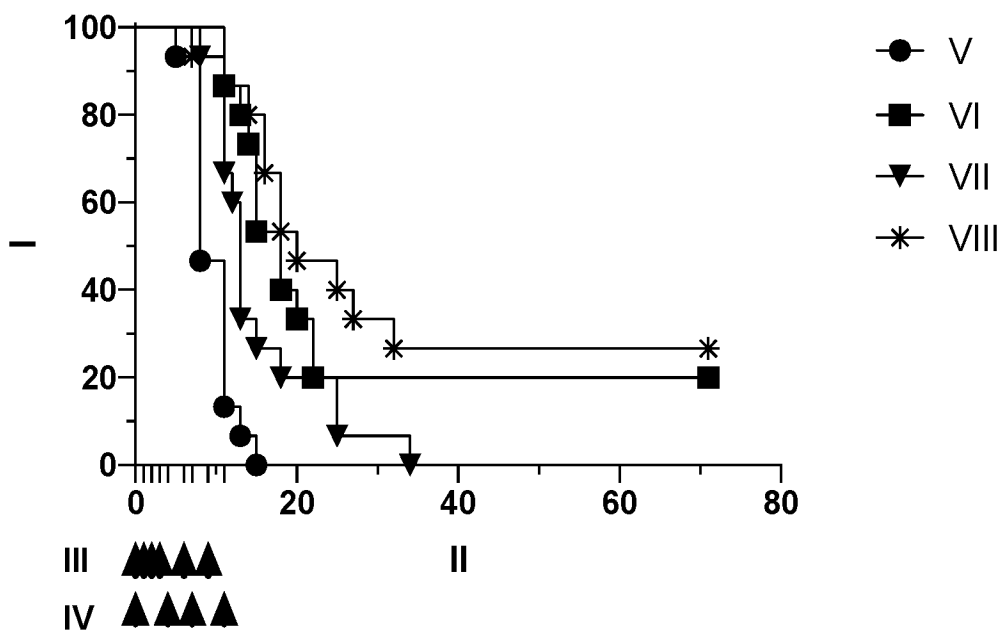
23/43
Фигура 23



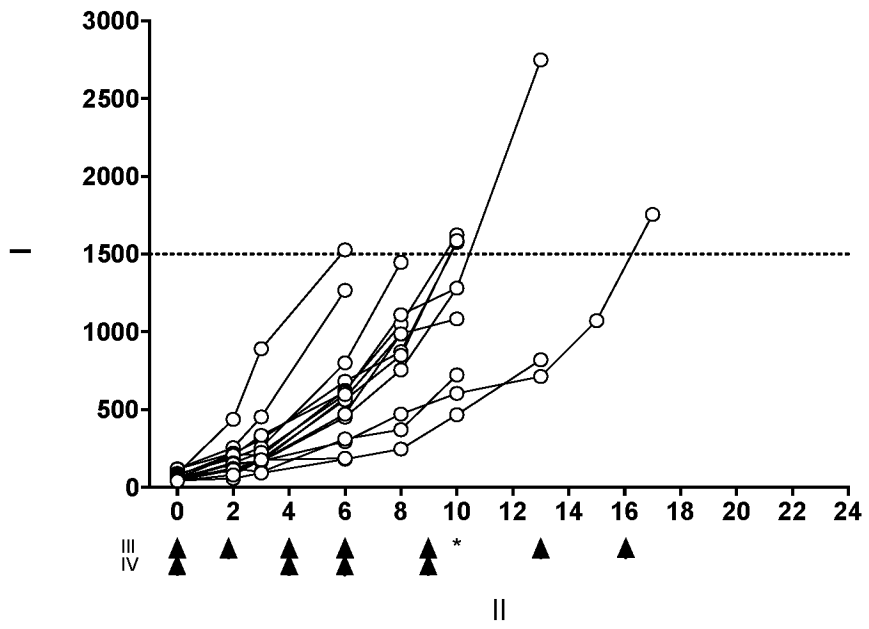
24/43
Фигура 24



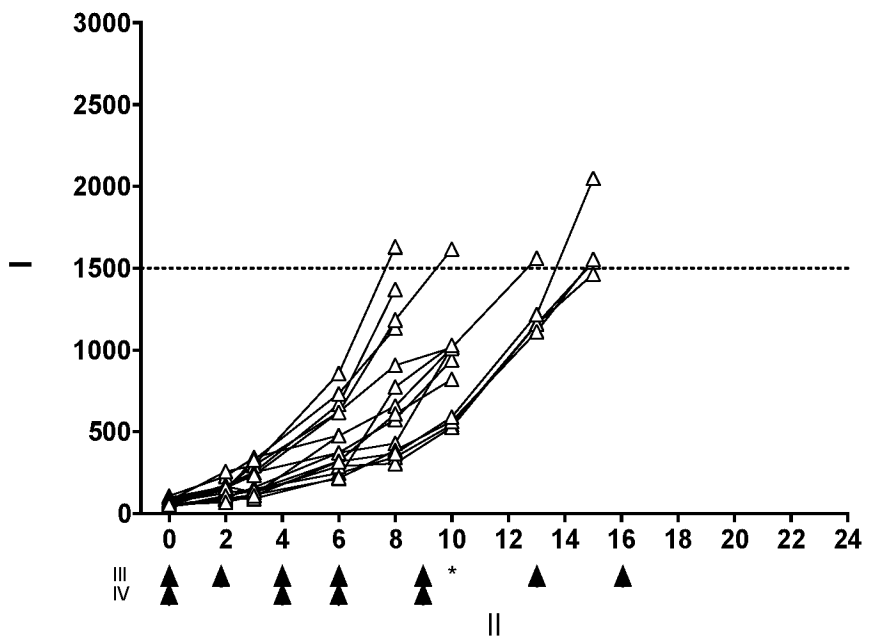
25/43
Фигура 25



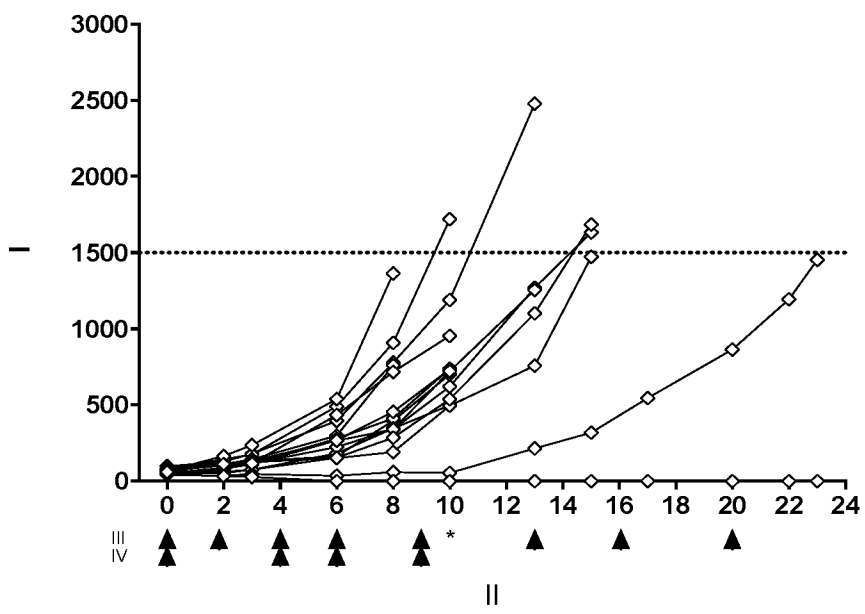
26/43
Фигура 26



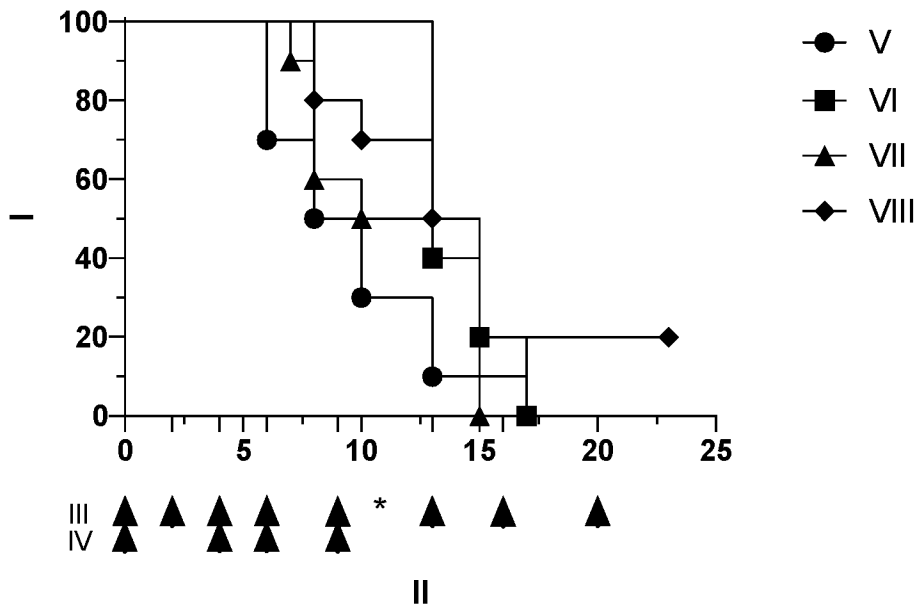
28/43
Фигура 28



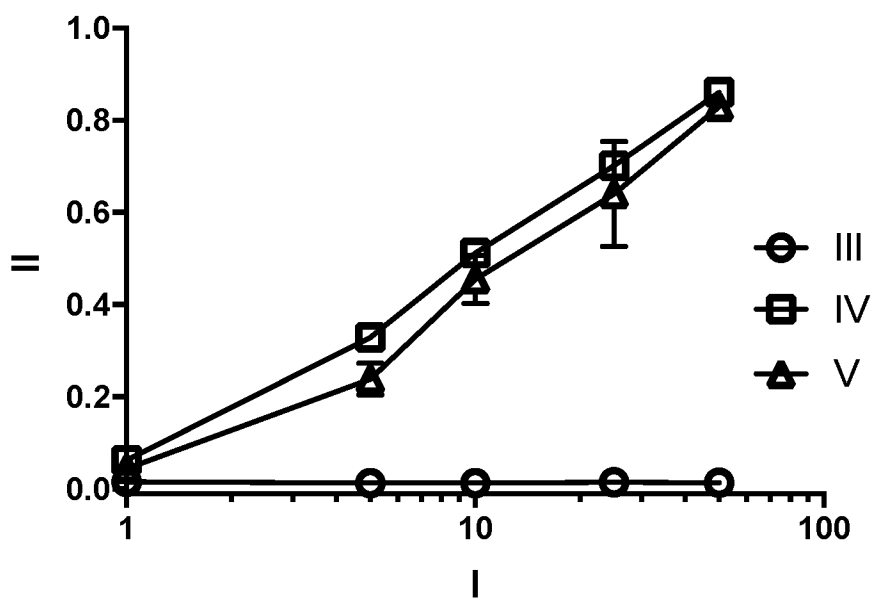
29/43
Фигура 29



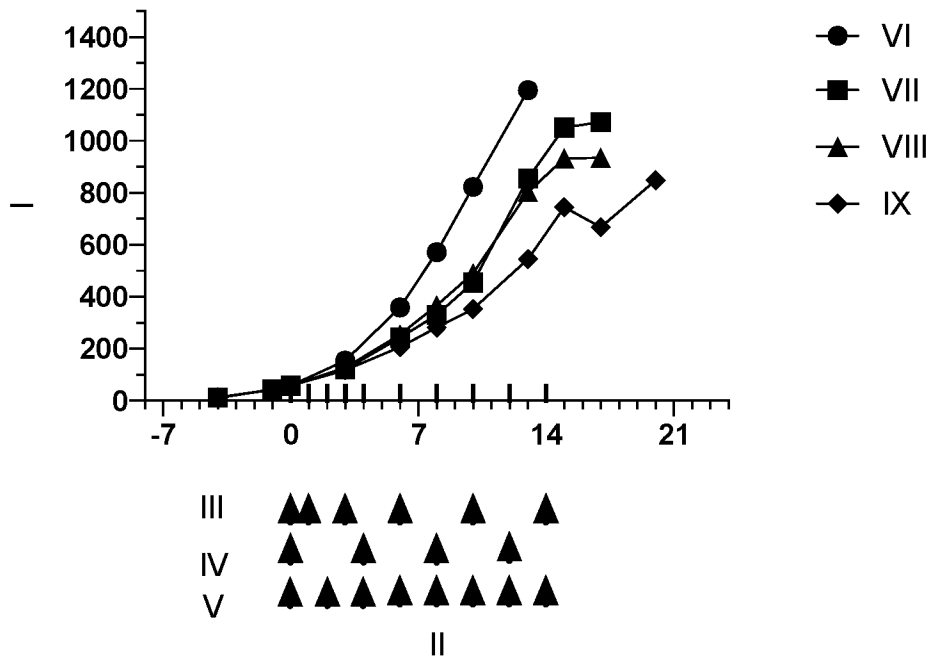
30/43
Фигура 30



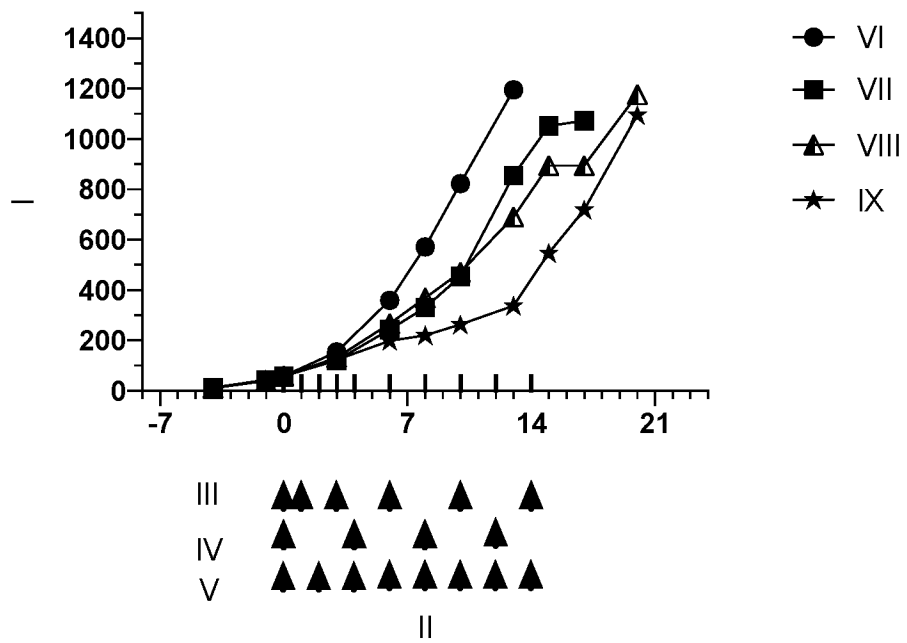
31/43
Фигура 31



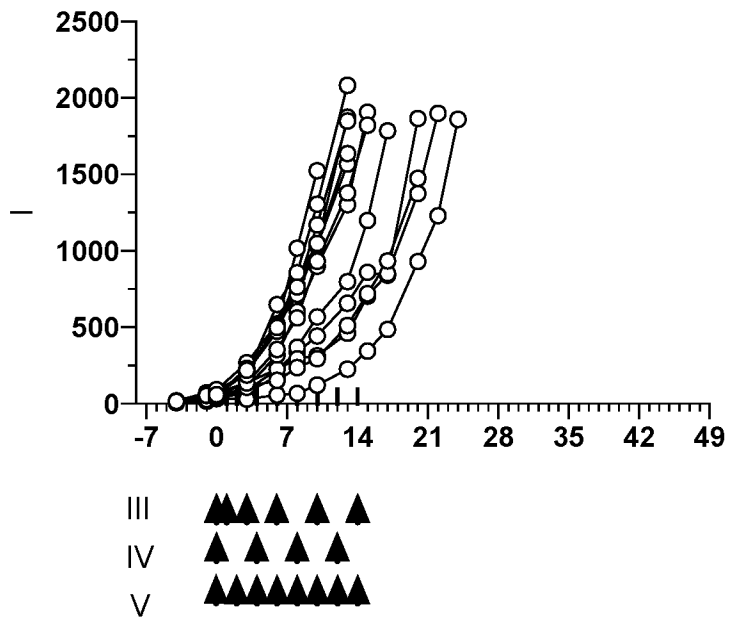
32/43
Фигура 32



33/43
Фигура 33

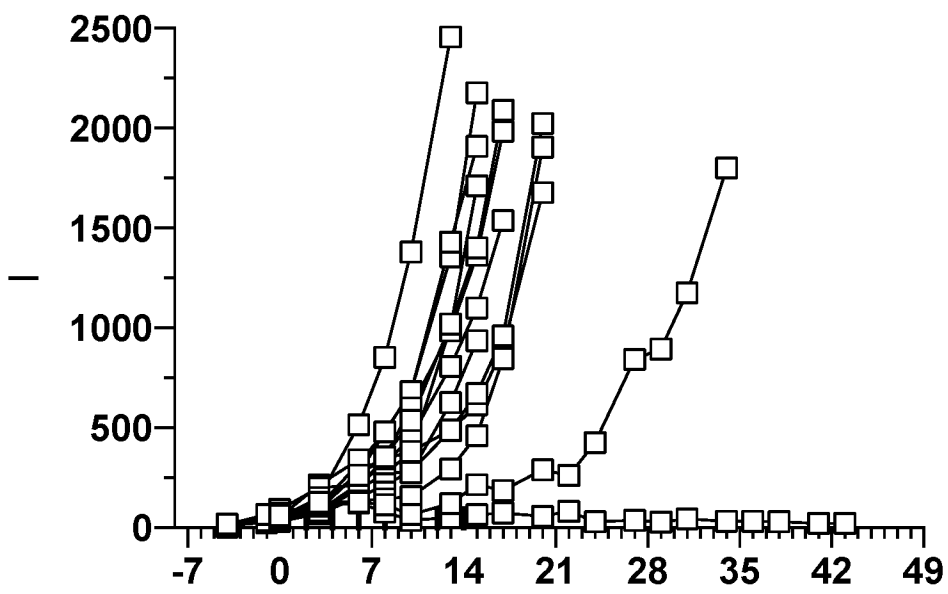


34/43
Фигура 34



II

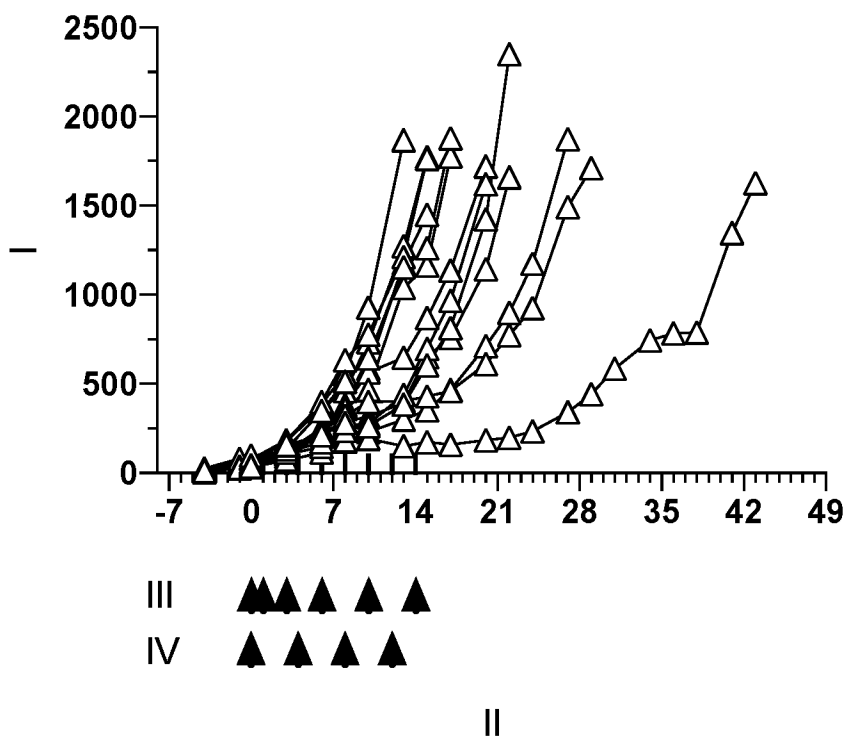
35/43
Фигура 35



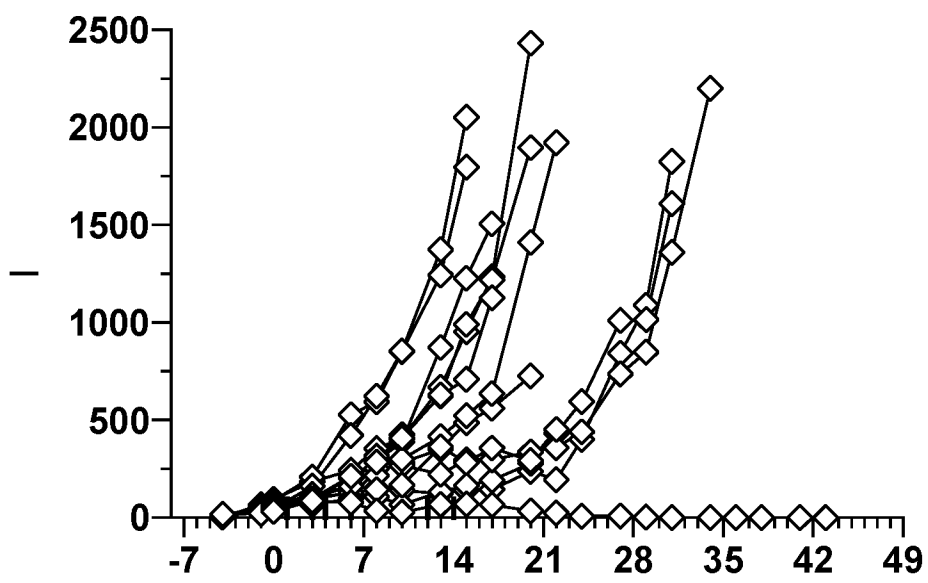
III ▲▲▲▲▲
IV ▲▲▲▲▲▲▲▲▲▲

II

36/43
Фигура 36



37/43
Фигура 37

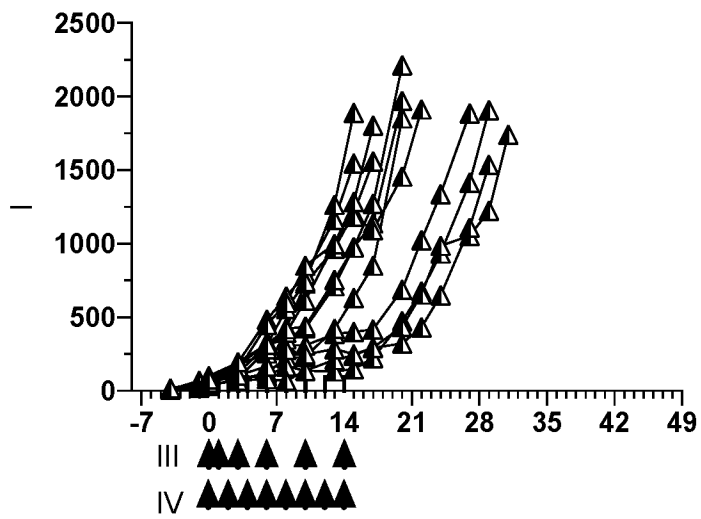


III ▲▲▲▲▲

IV ▲▲▲▲

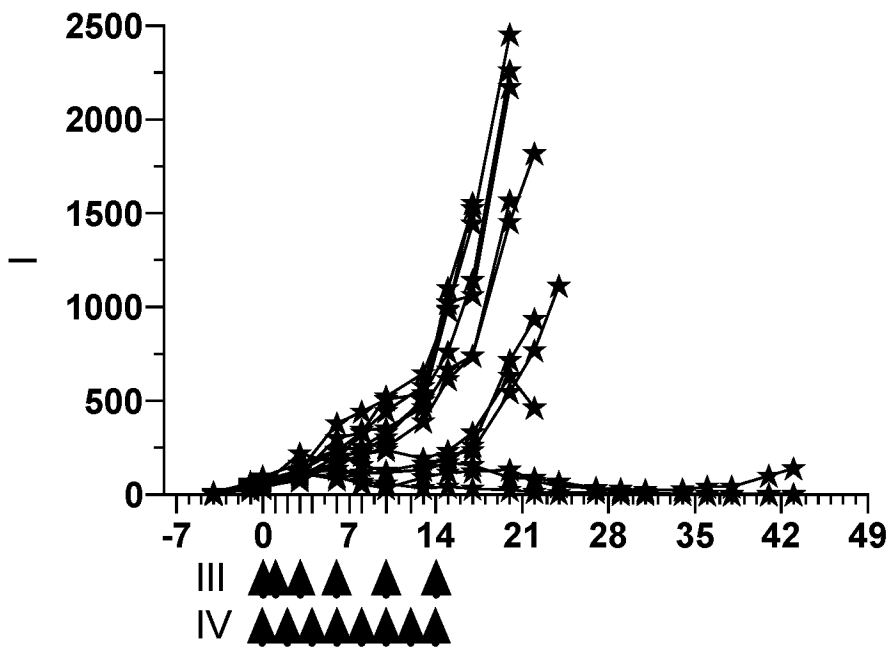
II

38/43
Фигура 38



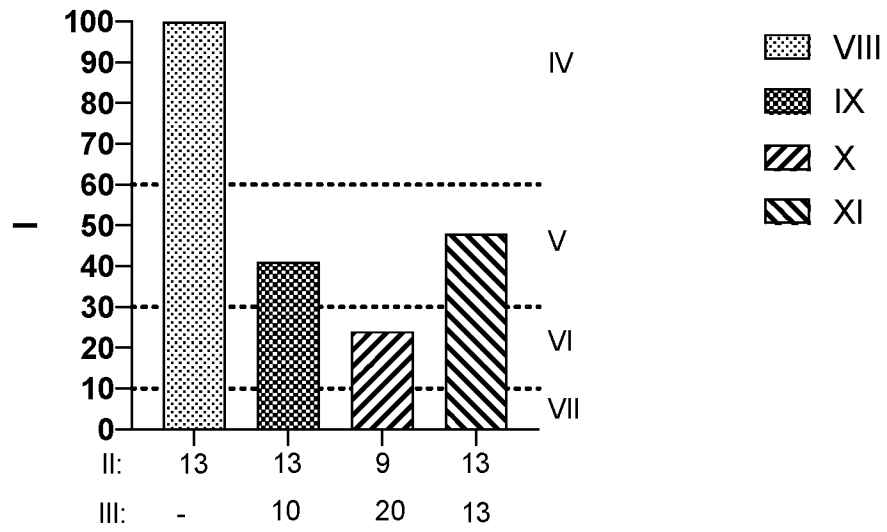
II

39/43
Фигура 39

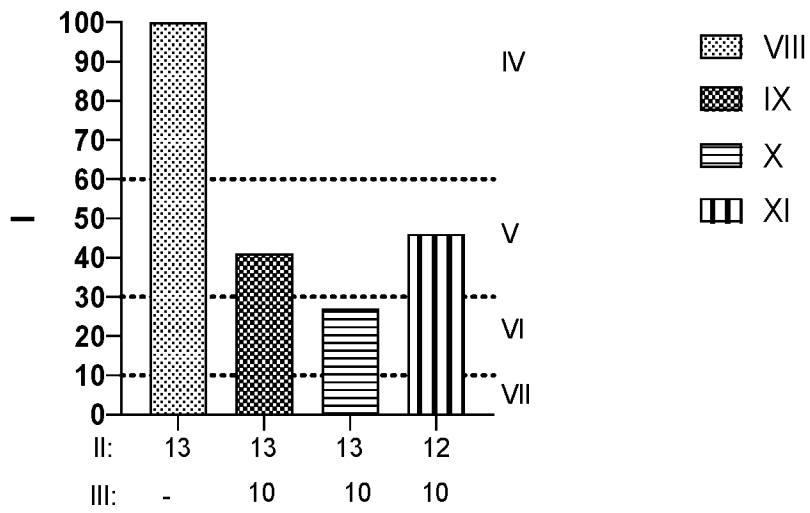


II

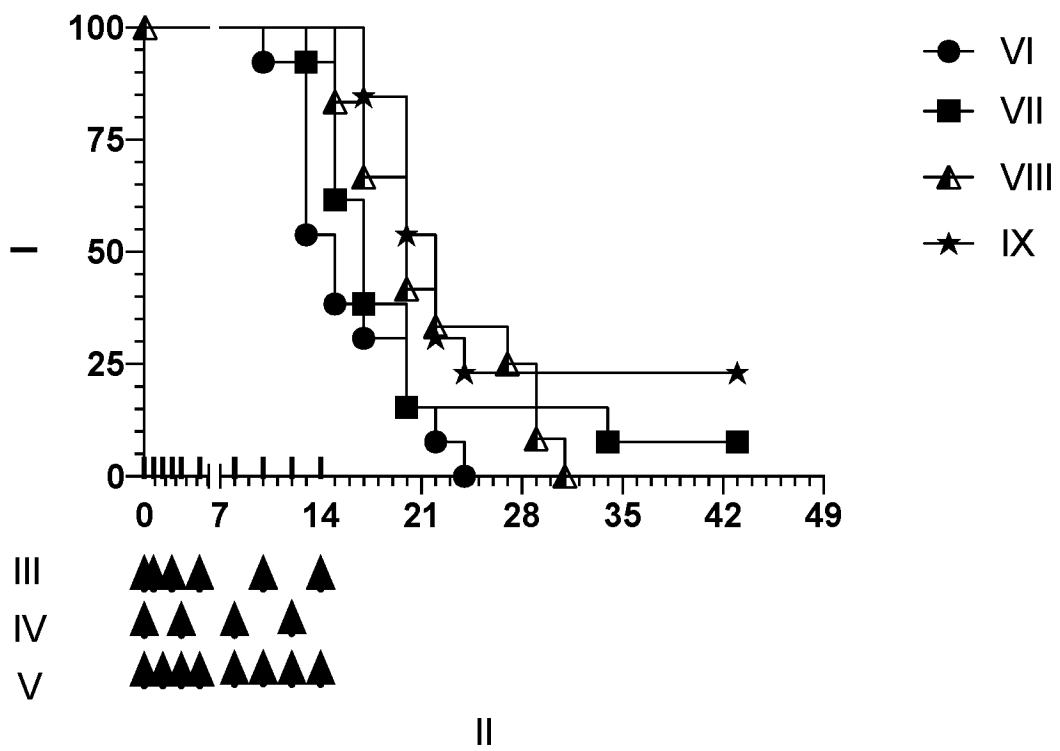
40/43
Фигура 40



41/43
Фигура 41



42/43
Фигура 42



43 / 43
Фигура 43

Название штамма	Исходный штамм	Вставка/важные характеристики	Белок, подлежащий доставке с помощью T3SS	Остов плазмиды	Название полученной плазмиды	Праймер T3T-Но.:	Устойчивость	Источник
Y. enterocolitica MRS40ΔHOPE MT	Y. enterocolitica	MRS40 + pYV- MRS40 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Iriarte and Cornelis, 1998
Y. enterocolitica MRS40ΔHOPE MT + pT3P_453	Y. enterocolitica MRS40ΔyopHO PEMT		YopE ₁₋₁₃₈ - Y. enterocolitica с двумя доменами CARD кодон- оптим/ированного RIG-1 человека (AK 1-245)	pBad_Si_2	pT3P_453	синтетический конструкт	Nal, Amp	
Y. enterocolitica MRS40ΔHOPE MT + pT3P_454	Y. enterocolitica MRS40ΔyopHO PEMT		YopE ₁₋₁₃₈ - Y. enterocolitica с двумя доменами CARD кодон- оптим/ированного RIG-1 мыши (AK 1- 246)	pBad_Si_2	pT3P_454	синтетический конструкт	Nal, Amp	
Y. enterocolitica MRS40ΔHOPE MT Y051 pT3P_751	Y. enterocolitica MRS40ΔyopHO PEMT		YopE ₁₋₁₃₈ - Y. enterocolitica с двумя доменами CARD кодон- оптим/ированного RIG-1 человека (AK 1-246) и YopE ₁₋₁₃₈ - Y. enterocolitica с кодон- оптим/ированным cGAS человека (AK 161-522)	PT3P-715 и pYV-Y004	pT3P_751 и pYV-Y051	синтетический конструкт и 887/955/ 956/888 + синтетический	Nal, Cam	